

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIELI LIMBERGER GALVAN

**AVALIAÇÃO GENOTÓXICA DE EFLUENTES QUÍMICOS DE LABORATÓRIOS
DE INSTITUIÇÃO DE ENSINO E PESQUISA UTILIZANDO COMO BIOINDICADOR
O PEIXE *Astyanax altiparanae* (CHARACIDAE)**

CURITIBA

2011

GABRIELI LIMBERGER GALVAN

**AVALIAÇÃO GENOTÓXICA DE EFLUENTES QUÍMICOS DE LABORATÓRIOS
DE INSTITUIÇÃO DE ENSINO E PESQUISA UTILIZANDO COMO BIOINDICADOR
O PEIXE *Astyanax altiparanae* (CHARACIDAE)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ecologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marta Margarete Cestari.

Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Itsuo Yamamoto.

CURITIBA

2011

***Aos que investigam, questionam,
modificam e lutam por um mundo
melhor.***

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, pela oportunidade, pela confiança no meu trabalho, por acreditar em meu potencial e também por lutar pelos interesses e sempre incentivar o desenvolvimento pessoal e profissional de todos os seus alunos.

Ao meu professor co-orientador Carlos Itsuo Yamamoto, por aceitar colaborar com este trabalho mesmo não sendo de sua área de atuação e por toda atenção e prontidão em me ajudar.

Aos professores membros da banca de avaliação, Prof. Dr. Marcos Vinícius Mocelin. Ferraro, Prof. Dr. Luiz Fernando de Lima Luz Junior e Prof^a. Dr^a Viviane Prodócimo por enriquecerem o trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, incluindo todos os professores pelos valiosos ensinamentos, troca de conhecimento e momentos de descontração, a todos os colegas, principalmente aos amigos, Leandro (Mogli), Itiberê, Ana Rigo, Silvia, Igor, Adri e Flavinho, por todo o companheirismo e à secretária Valéria por sempre me apoiar e me fazer refletir sobre as escolhas importantes da vida.

À Capes e ao grupo Aquatoxi pelo auxílio financeiro.

Ao CEPPA pela realização das análises físico-químicas das amostras dos efluentes.

À Carol (PDA) pelo auxílio na coletas.

Aos meus amigos do Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental, Wanessa, Taynah, Laercio, Gus, Tati, Paula, Toni, Cabelo, Manu, Bianca, Balen, Giselle, Nédia, Noletto, Cristina e Áurea pelo apoio na execução do projeto e por transformarem o ambiente de trabalho num local divertido.

Aos meus familiares, pelo ótimo exemplo de luta e perseverança e pelo amor, apoio e compreensão em todos os momentos da minha vida.

Ao meu namorado Yuri, por todo o amor e dedicação e à sua família pelo grande apoio e carinho.

À Deus, pela compaixão, vida e proteção.

***A alegria está na luta, na tentativa,
no sofrimento envolvido e não na
vitória propriamente dita.***

Mahatma Gandhi

RESUMO

A degradação da qualidade da água pelo despejo de efluentes vem colocando em risco a saúde dos organismos, inclusive das populações humanas, sendo um problema ambiental de escala global. Os efluentes provenientes dos laboratórios das instituições de ensino e pesquisa, mesmo sendo compostos por misturas complexas, são raramente avaliados e fiscalizados por órgãos ambientais. Desta forma, o presente estudo objetiva avaliar os efeitos genotóxicos em indivíduos de *Astyanax altiparanae* expostos aos efluentes químicos pré e pós-tratamento, provenientes de laboratórios do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Paraná, através da técnica do ensaio cometa e teste do micronúcleo (MN) e alterações morfológicas nucleares (AMN). Os peixes foram expostos às concentrações de 10%, 50% e 100% do efluente bruto (EB) e do efluente tratado (ET) pelo período de 96 horas, foram utilizados 60 peixes por concentração do contaminante, sendo amostrados 15 indivíduos a cada 24 horas. O ensaio cometa foi avaliado em eritrócitos e células branquiais. As freqüências de micronúcleo (MN), alterações morfológicas nucleares (AMN) e eritrócitos imaturos (EI) foram analisadas em eritrócitos. Os resultados obtidos através do ensaio cometa indicam que em todas as concentrações e períodos de exposição, ambos os efluentes induziram danos no material genético dos tipos celulares avaliados. Tanto nos eritrócitos quanto nas células branquiais houve redução do efeito genotóxico no tempo de 48 horas na concentração de 10%. De maneira geral, o ET apresentou maior potencial genotóxico do que o EB nas concentrações de 50% e 100%. Foram obtidas baixas freqüências de MN e AMN, sendo observado decréscimos nas freqüências de MN em todos os grupos contaminados no tempo de 72 horas e nas freqüências de AMN nos grupos contaminados com os efluente tratado nos tempos de 24 e 48 horas e decréscimo na freqüência de EI em todos os tratamentos. Ambos os efluentes induziram danos no material genético e apresentaram caráter citotóxico, evidenciando que os efluentes avaliados causam risco ao ecossistema.

Palavras-chave: águas residuais, ensaio cometa, teste do micronúcleo, peixe.

ABSTRACT

The water quality degradation through effluent discharge is putting organisms, including human populations in health risk, being an environmental problem of global scale. Effluents from the laboratories of education and research institutes, despite being composed of complex mixtures, are rarely evaluated and oversight by environmental agencies. Thus, this study aims to evaluate the genotoxic effects in *Astyanax altiparanae* after exposure to raw and treated effluents from the laboratories of the Department of Chemical Engineering at the Federal University of Parana, using the technique of comet assay, micronucleus (MN) and nuclear abnormalities (NA) test. Fish were exposed to concentrations of 10%, 50% and 100% of raw effluent (RE) and treated effluent (TE) for 96 hours, and were sampled every 24 hours. The comet assay was assessed in erythrocytes and gill cells. The MN, nuclear abnormalities (NA) and immature erythrocytes (IE) frequencies were measured in erythrocytes. The results obtained through the comet assay indicate that in all concentrations and exposure times, both effluents induced DNA damage in the cell types analyzed. In erythrocytes and gill cells was observed decreased in the genotoxic effect at the time of the 48 hours in the lowest concentration. In general, at higher concentrations, the TE shows more genotoxic effects than RE. Were obtained low frequencies of MN and AN. Decreases in MN frequencies in all contaminated groups was obtained at 72 hours, in NA lower frequencies were obtained in TE groups at 24 and 48 hours. Decreases in EI frequencies were observed at all groups. Both effluents induced DNA damage and showed cytotoxic effect, concluding that the effluents from laboratories evaluated cause risk to ecosystem.

Keywords: wastewater, comet assay, micronucleus test, fish.

LISTA DE SIGLAS

| | |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------|
| %oAMN: | Freqüência de alterações morfológicas nucleares em 1000 células |
| %oEI: | Freqüência de eritrócitos imaturos em 1000 células |
| %oMN: | Freqüência de micronúcleos em 1000 células |
| AMN: | Alterações morfológicas nucleares |
| B[a]P: | Benzo[a]pireno |
| BER: | Reparo por excisão de pares de bases |
| BL: | Núcleo Blebbed |
| BN: | Binúcleo |
| CL ₅₀ : | Concentração letal mediana |
| DNA: | Ácido desoxirribonucléico |
| D-R: | Dose-resposta |
| D-T-R: | Dose-tempo-resposta |
| EB: | Efluente bruto |
| EB ₁₀ : | Efluente bruto na concentração de 10% |
| EB ₁₀₀ : | Efluente bruto na concentração de 100% |
| EB ₅₀ : | Efluente bruto na concentração de 50% |
| EI: | Eritrócito(s) imaturo(s) |
| ET: | Efluente tratado |
| ET ₁₀ : | Efluente tratado na concentração de 10% |
| ET ₁₀₀ : | Efluente tratado na concentração de 100% |
| ET ₅₀ : | Efluente tratado na concentração de 50% |
| HC: | Hidrato de cloral |
| I.P. : | Injeção intra-peritonal |
| LA: | Laranja de acridina |
| LB: | Núcleo Lobed |
| M±EP: | Média e erro padrão |
| MMS: | Metil metano sulfonato |
| MN: | Micronúcleo(s) |
| NCE(s): | Eritrócito(s) normocromático(s) |
| NER: | Reparo por excisão de nucleotídeos |
| NT: | Núcleo Notched |

| | |
|---------|-----------------------------------------------|
| PAHs: | Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos |
| PCBs: | Policlorobifenóis |
| PCE(s): | Eritrócito(s) policromático(s) |
| RAPD: | Amplificação aleatória de DNA polimórfico |
| SCG: | Eletroforese em gel de célula individualizada |
| TBT: | Tributil estanho |
| V.S. : | Variação sazonal |
| VC: | Núcleo Vacuolated |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Exemplar de <i>Astyanax altiparanae</i> (Characidae). | 22 |
| Figura 2. Teste de toxicidade em <i>Astyanax altiparanae</i> após exposição aguda aos efluentes químicos e à substância de referência..... | 53 |
| Figura 3. Ensaio cometa em eritrócitos de <i>Astyanax altiparanae</i> | 56 |
| Figura 4. Danos no DNA em eritrócitos de <i>Astyanax altiparanae</i> após exposição aguda aos efluentes químicos. | 57 |
| Figura 5. Danos no DNA em células branquiais de <i>Astyanax altiparanae</i> após exposição aguda aos efluentes químicos. | 58 |
| Figura 6. Micronúcleos (MN) e alterações morfológicas nucleares (AMN) em eritrócitos periféricos poli e normocromáticos de <i>Astyanax altiparanae</i> | 61 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Bioensaios realizados com diferentes contaminantes utilizando o ensaio cometa como indicador de genotoxicidade. | 10 |
| Tabela 2. Biomonitoramentos realizados em diferentes localidades utilizando o ensaio cometa como indicador de genotoxicidade. | 12 |
| Tabela 3. Bioensaios realizados com diferentes contaminantes utilizando o teste do micronúcleo como indicador de genotoxicidade. | 16 |
| Tabela 4. Biomonitoramentos realizados em diferentes localidades utilizando o teste do micronúcleo como indicador de genotoxicidade. | 18 |
| Tabela 5. Caracterização físico-química dos efluentes. | 52 |
| Tabela 6. Frequência média de eritrócitos imaturos (%EI), alterações morfológicas nucleares (%AMN) e micronúcleos (%MN) no sangue periférico de <i>Astyanax altiparanae</i> após exposição aguda aos efluentes bruto e tratado. | 62 |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 | Degradação dos ambientes aquáticos | 1 |
| 1.2 | Toxicologia | 2 |
| 1.3 | Ecotoxicologia | 4 |
| 1.4 | Genética ecotoxicológica..... | 6 |
| 1.4 | Ensaio cometa..... | 7 |
| 1.5 | Teste do micronúcleo | 13 |
| 1.6 | Espécie bioindicadora: <i>Astyanax altiparanae</i> (Characidae) | 20 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 24 |
| 3 | OBJETIVOS | 25 |
| 3.1 | Objetivo geral | 25 |
| 3.2 | Objetivos específicos | 25 |
| | REFERÊNCIAS..... | 26 |
| 4 | ARTIGO..... | 42 |
| 4.1 | Introdução | 45 |
| 4.2 | Material e Métodos | 47 |
| 4.2.1 | Estação de tratamento de efluentes | 47 |
| 4.2.2 | Coleta e preservação das amostras | 48 |
| 4.2.3 | Condições experimentais | 48 |
| 4.2.4 | Teste de toxicidade aguda | 48 |
| 4.2.5 | Bioensaio de genotoxicidade..... | 49 |
| 4.2.6 | Ensaio cometa..... | 49 |
| 4.2.7 | Teste do micronúcleo (MN) e alterações morfológicas nucleares (AMN)..... | 50 |
| 4.2.8 | Frequência de eritrócitos imaturos (% _o EI)..... | 50 |
| 4.2.9 | Análise estatística | 50 |
| 4.3 | Resultados e Discussão..... | 51 |
| 4.3.1 | Caracterização físico-química dos efluentes | 51 |
| 4.3.2 | Teste de toxicidade aguda | 53 |
| 4.3.3 | Ensaio cometa..... | 55 |
| 4.3.4 | Teste do micronúcleo (MN) e alterações morfológicas nucleares (AMN)..... | 60 |
| 4.3.5 | Frequência de eritrócitos imaturos (% _o EI)..... | 64 |
| 4.4 | Conclusões..... | 65 |
| | Agradecimentos | 67 |
| | Referências | 68 |
| | APÊNDICES..... | 75 |
| | Metodologia..... | 75 |
| 1 | Teste de toxicidade aguda | 75 |
| 2 | Ensaio cometa..... | 79 |
| 3 | Teste do micronúcleo com coloração fluorescente de laranja de acridina | 85 |
| | ANEXOS | 88 |
| 1 | Certificação do comitê de ética em experimentação animal..... | 88 |
| 2 | Licença ambiental da piscicultura fornecedora dos peixes | 89 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Degradação dos ambientes aquáticos

Os ecossistemas aquáticos representam componentes críticos do ambiente global com essencial contribuição para biodiversidade e produtividade ecológica e proporcionam grande variedade de serviços insubstituíveis para a população humana (POFF *et al.*, 2002) que incluem o uso de água potável, de irrigação, uso industrial e doméstico, desenvolvimento de aquicultura e geração de energia hidrelétrica, navegação, manutenção da fertilidade do solo, equilíbrio térmico do planeta, diluição de efluentes, atividade recreacional e beleza paisagística (POSTEL, 2007; SPERLING, 1993).

O Brasil é rico em recursos hídricos e detém cerca de 8% da reserva de água doce do planeta, sendo que 80% encontra-se na região Amazônica, ficando os restantes 20% nas áreas onde se concentra 95% da população (ASSIS, 1998).

Em função da distribuição populacional ser geograficamente desproporcional, a alta demanda por água afeta córregos, rios, lagos, aquíferos e ecossistemas aquáticos relacionados (FITZHUGH e RICHTER, 2004). Além disso, o crescimento populacional desordenado gera diversos impactos sobre os ecossistemas naturais, que direta ou indiretamente afetam os recursos hídricos.

A alteração da paisagem pela urbanização afeta a dinâmica dos ecossistemas aquáticos, através da modificação de canais de rios e margens de lagos por meio de diques, canalização, drenagem, inundações de áreas alagáveis e dragagem para navegação (MORAES e JORDÃO, 2002), interrompendo o funcionamento dos ecossistemas aquáticos em larga escala (POSTEL, 2007).

Devido ao elevado crescimento populacional, grandes quantidades de águas residuais provenientes de atividades industriais, agrícolas, domésticas e hospitalares são despejadas diretamente nos ambientes aquáticos. Adicionalmente, a crescente necessidade em fornecer alimentos e energia gera uma maior devastação pela agricultura e pecuária, pondo em risco as nascentes e rios (ESPÍNDOLA e BRIGANTE, 2003).

O aumento da degradação dos ambientes aquáticos vem sendo acompanhado pela crescente demanda por água de qualidade para consumo humano, tornando a contaminação dos recursos hídricos um problema ambiental e de saúde pública.

1.2 Toxicologia

A toxicologia objetiva identificar os poluentes e descrever seus mecanismos tóxicos e efeitos fisiológicos em animais e seus componentes (ALCARAZ, 2000), levando em consideração o tempo de exposição e a concentração do agente xenobiótico (ZAGATTO *et al.*, 1988).

Os testes de toxicidade podem ser definidos como procedimentos nos quais as respostas de organismos-teste são utilizadas para detectar ou avaliar os efeitos adversos ou não de uma ou mais substâncias sobre os sistemas biológicos. Estes testes constituem-se basicamente na exposição de organismos a diferentes condições, as quais tentam simular o ambiente natural, visando assim a detectar seus efeitos letais e/ou subletais.

Os testes de toxicidade aquática podem ser aplicados para determinar a sensibilidade do organismo em relação a um agente tóxico, para avaliar a qualidade de água e as concentrações seguras de agentes químicos para preservação da vida aquática e determinar a eficiência de diferentes métodos de tratamento de efluentes (METCALF e EDDY, 2003).

Os testes de toxicidade podem ser crônicos ou agudos. O efeito crônico é definido como sendo a resposta a um estímulo que continua por um longo tempo, onde esses períodos podem durar parte ou todo o ciclo de vida dos organismos aquáticos (ZAGATTO *et al.*, 1992). Geralmente, os efeitos crônicos são subletais sendo observados quando as concentrações do agente tóxico permitem a sobrevivência dos organismos, no entanto, causam distúrbios em suas funções biológicas (GOLDSTEIN, 1988).

O teste de toxicidade aguda avalia a capacidade inerente da amostra em produzir efeitos deletérios nos organismos-teste (usualmente letalidade ou alguma outra manifestação que a anteceda), em curto período de exposição em relação ao seu ciclo de vida (CONSEMA: Resolução n.º 129/2006).

Uma medida importante nos testes de toxicidade e amplamente utilizada no campo da ecotoxicologia é a determinação da concentração letal mediana (CL₅₀) que pode ser definida como a menor concentração de uma substância capaz de causar efeito deletério a 50% dos organismos. Fatores de segurança são, então, estimados para assegurar a proteção dos organismos em condições naturais (KNIE e LOPES, 2004).

Os organismos mais utilizados em testes de toxicidade são os microcrustáceos *Daphnia sp*, *Atenia sp*, *Ceriodaphnia sp*, *Mysidopsis bahiau*; a bactéria marinha *Vibrio Fischeri*; os peixes *Poecilia reticulada*, *Hemigrannus marginatus*, *Brachydanio rerio* e *Cheirodon notomelas*; e entre o fitoplâncton pode se destacar *Chorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus subspicatus* e *Skeletonema costatum*.

O controle e a avaliação de agentes tóxicos existentes em efluentes líquidos têm sido feito através da análise de substâncias específicas ou do efluente como um todo (CARTER, 1986).

No entanto, a análise de substâncias isoladamente não fornece informações suficientes devido às inúmeras substâncias que são emitidas aos corpos d'água (CETESB, 1990), e que muitas vezes não apresentam padrões de lançamento pela legislação brasileira. Além disso, as atividades biológicas, proporcionadas pela biota aquática, podem interagir com as substâncias presentes nos efluentes, tornando inviável a identificação de uma única substância como responsável por um determinado efeito (CARTER, 1986). Já análise de toxicidade de toda a composição do efluente remete à complexidade dos compostos e às interações que podem ocorrer como efeitos aditivos, sinérgicos e antagônicos (ZAGATTO *et al.*, 1988).

Existem poucos estudos que correlacionam a tratabilidade dos efluentes com sua toxicidade (QUAGLIA e QUADROS, 1995). A grande maioria dos trabalhos aborda principalmente as características físico-químicas do efluente e seus impactos no corpo receptor. O emprego de testes de toxicidade aguda em efluentes permite avaliar os possíveis impactos que às vezes a simples caracterização físico-química da água não revela (LAITANO e MATIAS, 2006).

Os testes de toxicidade quando aliados às análises físico-químicas permitem a ampla avaliação dos efeitos de agentes tóxicos no ecossistema aquático (FRACÁCIO *et al.*, 2003) e através de respostas obtidas com a utilização de

biomarcadores específicos, que atuam em outros níveis biológicos, podem gerar informações relevantes sobre os efeitos de substâncias complexas no ambiente.

1.3 Ecotoxicologia

A ecotoxicologia foi definida pela primeira vez por Truhaut (1969, *apud* TRUHAUT, 1977) como uma extensão natural da toxicologia, que descreve o efeito tóxico de vários agentes em organismos vivos, comunidades e populações. Essencialmente a ecotoxicologia abrange duas áreas principais: o estudo do ambiente e o estudo das interações de substâncias tóxicas nos organismos vivos, sendo uma ciência multidisciplinar, que envolve conhecimentos das áreas de química, biologia, farmacologia, epidemiologia, fisiologia e ecologia (CONNELL *et al.*, 1999).

Segundo Winteringham (1977), o termo ecotoxicologia é adotado como um estudo comparativo e integrado dos efeitos tóxicos de contaminantes sobre a fauna e flora, ou ecossistema ou sobre uma unidade definida destes. É o estudo do destino e efeito de substâncias tóxicas no ecossistema baseado em pesquisas de campo e laboratório (KENDALL, 1992; HOFFMAN *et al.*, 1995), que utiliza respostas espécie-específicas ou impactos em elevados níveis de organização (KENDALL *et al.*, 2001). De acordo com a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA, 1998), é uma análise crítica dos efeitos adversos que podem ocorrer após exposição a um ou mais agentes estressores, sendo fundamental para a avaliação de risco ecológico (NEWMAN, 1996).

A junção da toxicologia com ecologia originou uma linha científica com uma abordagem ampla, que investiga os efeitos tóxicos causados por poluentes naturais ou sintéticos e, objetiva quantificar e predizer a magnitude de estresse em populações naturais, comunidades ou ecossistemas, sendo importante ferramenta para prevenção de impactos sobre os ecossistemas e restauração de seus serviços e funções (MORIARTY, 1999).

Baseando-se em alterações em uma unidade do ecossistema, pode-se avaliar o efeito de poluentes em indivíduos, populações, comunidades ou e/ou ecossistemas, que comprometem a composição e função ambiental (BROUWER *et al.*, 1990). A ecotoxicologia avalia, através de técnicas e metodologias sofisticadas, o

impacto ambiental de contaminantes em diferentes níveis de organização biológica (ELLIOT *et al.*, 2010).

Os testes ecotoxicológicos permitem, sob condições controladas, determinar as concentrações dos agentes químicos que causam efeitos danosos aos organismos aquáticos e têm ampla utilização no desenvolvimento de padrões e/ou critérios de qualidade para a proteção das comunidades (BERTOLETTI, 2000).

De acordo com Jha (2008), a simples detecção de contaminantes em compartimentos abióticos e bióticos não é suficiente a menos que seus efeitos biológicos ou ecológicos sejam devidamente avaliados, desta forma, torna-se necessária a utilização de biomarcadores ecotoxicológicos para determinar os efeitos subletais dos contaminantes em baixas doses ou concentrações e ainda avaliar de forma preditiva e de alta relevância ecológica os efeitos de tal exposição.

Os biomarcadores vêm sendo aplicados em vários tipos de organismos, e permitem avaliar de forma sensível os efeitos agudos ou crônicos da exposição a agentes tóxicos que atuam na detecção de alterações em diferentes níveis de organização biológica.

A *National Academy of Sciences* define biomarcadores como uma alteração em componentes, processos, estruturas ou funções em sistemas ou amostras biológicas. Sendo comumente utilizados como indicadores bioquímicos, fisiológicos e histológicos de exposição à xenobióticos ou de efeitos de contaminantes químicos (HUGGETT *et al.*, 1992) e podem ser categorizados como marcadores de exposição, efeito ou susceptibilidade (ATSDR, 1994 *apud* KENDALL *et al.*, 2001).

Os biomarcadores são uma ferramenta de avaliação do efeito tóxico de substâncias poluentes que atuam em diferentes níveis de complexidade (individual, celular e molecular) e são utilizados para a elucidação da relação causa-efeito e dose-efeito na avaliação de risco à saúde. Perturbações em funções subcelulares podem afetar o desempenho e a saúde dos organismos e ser traduzidos em efeitos nas populações e comunidades (KENDALL *et al.*, 2001).

Jha (2008) sugere que o estabelecimento de correlações entre diferentes biomarcadores é importante quando há variabilidade de resposta entre espécies frente a um agente tóxico, como resultado de diferenças inter-específicas nas taxas de absorção, acumulação, metabolismo, excreção e eficiência de reparo de DNA. Desta forma, a adoção de múltiplos biomarcadores em uma variedade de espécies

está sendo defendida para uma ampla avaliação do impacto de poluentes nos ecossistemas.

1.4 Genética ecotoxicológica

A genética ecotoxicológica é um campo da ciência relativamente novo que avalia o efeito de poluentes (mutagênico, clastogênico e/ou aneugênico) no material genético dos organismos (KENDALL *et al.*, 2001). Esses efeitos são denominados genotóxicos por induzirem alterações estruturais nos cromossomos (clastogenicidade) ou nas sequências de pares de bases (mutagenicidade) (AL-SABTI e METCALFE, 1995), assim como modificações químicas ou físicas como aductos ou quebras nas fitas de DNA (AKCHA *et al.*, 2004).

Aductos são específicos à substância exposta e a ocorrência é relativamente rara, já as quebras nas fitas de DNA não são respostas específicas, sendo as primeiras e mais comuns consequências da exposição a agentes genotóxicos. Deste modo, a observação de quebras nas fitas de DNA pode fornecer informações sobre a formação de lesões no DNA por si só, bem como a dinâmica associada com a manutenção da integridade genômica, visto que quebras das fitas fazem parte do processo de reparo do DNA por excisão de pares de bases (NACCI *et al.*, 1996).

A exposição a agentes genotóxicos afeta algumas estruturas e funções do material genético das células (FABACHER *et al.*, 1991) que podem levar a mutações (DE FLORA *et al.*, 1991), induzir o desenvolvimento de câncer (ZEGURA *et al.*, 2009; BAUMANN e HARSHBARGER, 1995; BAUMAN, 1998; MYERS *et al.*, 1991; VETHAK e ap RHEINALLT, 1992; FOLMAR *et al.*, 1993), teratogênese e embriogênese (MITCHELMORE e CHIPMAN, 1998).

Os efeitos genotóxicos, podem não se manifestar por diversas gerações, mas quando surgem podem ter um efeito significativo na população, já que muitas mutações afetam o desempenho dos organismos (PANDRANGI *et al.*, 1995) e aumentam o risco de desenvolvimento de doenças, como a síndrome da doença genotóxica, que sugere que invertebrados que não obtiverem tumores, os genotóxicos poderiam transmitir os impactos prejudiciais sobre a saúde dos organismos, e em última análise, levar a população extinção (KURELEC, 1993).

Os agentes genotóxicos podem não causar nenhum efeito diretamente deletério no organismo, mas se afetar as células germinativas, pode comprometer as gerações subsequentes, através da indução de mutações, comprometendo a estrutura e desempenho populacional.

Além dos efeitos diretos no DNA, Bickham e Smolen (1994) propõem que as seleções resultantes de estresse de efeitos somáticos de contaminantes podem levar a alterações na genética populacional que não são preditivas através do conhecimento dos mecanismos toxicológicos. Mudanças na composição genética de populações envolvem alterações na sobrevivência e recrutamento, sendo indicadores de efeitos adversos crônicos na estrutura e dinâmica de populações e comunidades (KENDALL *et al.*, 2001; NACCI *et al.*, 1996).

A seleção de genótipos resistentes aos poluentes, assim como efeitos de gargalo genético, resulta em redução do tamanho populacional ou recrutamento e perda de variabilidade genética (THEODORAKIS e SHUGART, 1998).

Desta forma, em função da ampla implicação ecológica associada à genotoxicidade, a detecção e quantificação de danos genéticos são de grande interesse em estudos ambientais. O grau de integridade do DNA tem sido proposto como um sensível indicador de genotoxicidade e um efetivo biomarcador para o monitoramento ambiental (SHUGART, 1990), gerando informações essenciais para agências regulatórias (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Embora tenham sido realizados progressos rápidos nas últimas décadas para determinar o impacto dos fatores ambientais sobre a indução de danos genéticos em populações humanas, verificou-se um progresso relativamente limitado para determinar o impacto de tais fatores em espécies nativas (PARSONS, 1992; CLARK, 1993).

1.4 Ensaio cometa

O ensaio cometa recebe este nome devido a aparência de cada nucleóide quando submetido à eletroforese (OLIVE, 1990), sendo também conhecido como eletroforese em gel de célula individualizada ou single-cell gel electrophoresis (SCG). Neste ensaio, para a interpretação dos resultados, o “cometa” é dividido em cabeça e cauda, assim, as células sem ou com pouco dano no DNA não apresentam

cauda, enquanto as células com danos mais intensos apresentam caudas longas. O tamanho, intensidade da fluorescência, aspecto e outras características dos cometas são mensurados visualmente por microscopia ou por programas específicos de análise de imagem. As medidas mais comumente utilizadas da migração dos fragmentos do DNA são: extensão da cauda, momento da cauda, e percentual de DNA na cauda.

Atualmente o ensaio cometa é bem estabelecido, é simples, versátil, rápido e sensível, sendo amplamente utilizado como uma ferramenta de avaliação de dano e reparo no DNA, tanto quantitativamente, quanto qualitativamente em populações de células individualizadas (OLIVE e BANATH, 2006).

Desde a sua criação, no entanto, o ensaio tem sido modificado em várias etapas (lise, eletroforese, neutralização) para torná-lo adequado para avaliar vários tipos de danos em diferentes células (COLLINS, 2004; SPEIT e HARTMANN, 2005).

Ostling e Johanson (1984) foram os primeiros a quantificar danos no DNA em células individualizadas utilizando a eletroforese em microgel, no entanto, eles realizaram a técnica em condições neutras, possibilitando apenas a detecção de quebras de fita dupla do DNA. A modificação do pH da corrida de eletroforese, realizada em condição alcalina ($\text{pH} > 13$) por Singh *et al.* (1988) permitiu a detecção no DNA das quebras em fita simples e duplas, sítios álcali-lábeis e sítios de reparo tardio.

Atualmente é possível detectar lesões no DNA (incluindo danos oxidativos), reparo e morte celular (apoptose) em diferentes tipos de células, sem necessitar de prévio conhecimento do cariótipo e da taxa de renovação celular (JHA, 2008), quebras de fita simples (quebras nas fitas e sítios incompletos de reparação por excisão), sítios álcali-lábeis, ligações cruzadas, sítios incompletos de reparo, sítios abásicos e quebras de fita dupla (KUMARAVEL e JHA, 2006; KUMARAVEL *et al.*, 2007; SINGH *et al.*, 1989; OLIVE *et al.*, 1990; TICE *et al.*, 2000).

Em relação a outros testes de genotoxicidade, como aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs e teste do micronúcleo, as vantagens do ensaio cometa incluem a sensibilidade para a detecção de baixos níveis de lesões no DNA (uma quebra por 10^{10} Da de DNA) (GEDIK *et al.*, 1992), necessidade de um pequeno número de células por amostra, custo relativamente baixo, fácil aplicação, necessita de um curto período de tempo para completar um estudo e ainda pode ser

conduzido em células que estão em contato primário com as substâncias mutagênicas/carcinogênicas (DHAWAN, 2009) .

O ensaio cometa tem sido proposto como uma sensível, rápida, econômica e versátil ferramenta para a detecção de agentes genotóxicos em peixes (MITCHELMORE e CHIPMAN, 1998; WINTER *et al.*, 2004; FRENZILLI *et al.*, 2009; BARBOSA *et al.*, 2010), sendo aplicado em peixes sob condições laboratoriais (TEBELA 1) e em biomonitoramento de diversas regiões fortemente impactadas (TABELA 2).

Segundo Jha (2008) a aplicação do ensaio cometa é ampla, abrangendo uma série de grupos filogeneticamente distintos, utilizando grande variedade de agentes físicos e químicos, com os organismos em diferentes fases da vida, em diversos tipos celulares, sob condições de laboratório e de campo. No entanto, o autor ressalta que existem aspectos onde a aplicação do teste tem sido limitada, como: (a) atualmente o ensaio é aplicado com sucesso a um número limitado de espécies nativas, principalmente para aplicação em monitoramento ambiental; (b) são escassos os estudos ecotoxicológicos que aplicam a técnica nas células germinativas dos organismos; c) em espécies nativas existe pouca compreensão sobre os mecanismos de indução e reparo do DNA.

Tabela 1. Bioensaios realizados com diferentes contaminantes utilizando o ensaio cometa como indicador de genotoxicidade.

| Espécie | Tipo celular | Contaminante | Via | Tempo | Concentração | Resposta | Referências |
|--------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------|---------------------------------|
| <i>Hoplias malabaricus</i> | eritrócitos | Chumbo inorgânico (Pb ²⁺) | trófica | 64 dias | 21 µg Pb ²⁺ .g ⁻¹ | (+) | Cestari <i>et al.</i> (2004) |
| <i>Sparus aurata</i> | hepatócitos | Benzo[a]pireno (B[a]P) | I.P. | 6, 12, 24 e 48 h | 20 mg .kg ⁻¹ | (+) | Banni <i>et al.</i> (2009) |
| <i>Oreochromis niloticus</i> | eritrócitos | Anestésico triclaína (etil meta-aminobenzoato) | hídrica | 15 min e 4 h | 0, 150 mg .L ⁻¹ | (-) | Barreto <i>et al</i> (2007) |
| <i>Misgurnus anguillicaudatus</i> | hepatócitos e células pâncreáticas | Cd ²⁺ , Pb ²⁺ , Zn ²⁺ | hídrica | 1 – 35 dias | 0,05; 0,5 e 5,0 mg .L ⁻¹ | D-R | Zhang <i>et al</i> (2008) |
| <i>Mugil sp.</i> e <i>Netuma sp.</i> | eritrócitos | Metil metano sulfonato (MMS) | <i>in vitro</i> | 1, 2, 6, 24 h | 2, 4, 8 x 10 ⁻⁵ M | D-T-R | de Andrade <i>et al.</i> (2004) |
| <i>Hoplias malabaricus</i> | Eritrócitos e células renais | Chumbo Inorgânico (PbII) | I.P. | 96 h | 7, 21, 63 e 100 µg.g ⁻¹ | (+) | Ramsdorf <i>et al.</i> (2009) |
| <i>Hoplias malabaricus</i> | eritrócitos | Tributil estanho (TBT) e chumbo inorgânico (PbII) | trófica | 60 dias | 0,3 µg.g ⁻¹ (TBT) 21,0 µg.g ⁻¹ (PbII) | (-) | Ferraro <i>et al.</i> (2004) |
| <i>Mystus vittatus</i> | eritrócitos, células branquiais e renais | Pesticida Endosulfan | hídrica | 1, 7, 15, 22, 29, 36 e 43 dias | 0,20; 0,25 e 0,50 µg.L ⁻¹ | (+) | Sharma <i>et al.</i> (2007) |
| <i>Acanthopagrus schlegeli</i> | eritrócitos | Benzo[a]pireno (B[a]P), Methamidophos e mistura das substâncias | hídrica | 2, 5, 24 e 96 h | 2,0 µg. L ⁻¹ | (+) | Rixian <i>et al.</i> (2005) |
| <i>Prochilodus lineatus</i> | eritrócitos | Fração hidrossolúvel de óleo diesel | hídrica | 6, 24, 96 h e 15 dias | 50% | (+) | Vanzella <i>et al.</i> (2007) |
| <i>Pimephales promelas</i> | hepatócitos | Lodo de esgoto tratado | hídrica | 0, 3, 7, 14 e 28 dias | 0,5 e 2,5 g.L ⁻¹ | (+) | Sullivan <i>et al.</i> (2007) |
| <i>Oreochromis Niloticus</i> | eritrócitos | Efluente de indústria suína | hídrica | 7, 15, 30, 60 e 90 dias | Diluição efluente/água 1:5 e 1:2 | (+) | Lima <i>et al.</i> (2006) |

| | | | | | | | |
|--------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------------|----------------------------------------------------------------------------|-----|------------------------------|
| <i>Carassius auratus</i> | eritrócitos e células branquiais | Chorume bruto e tratado | hídrica | 9 dias | 10 e 100% | (+) | Deguchi <i>et al.</i> (2007) |
| <i>Gambusia affinis</i> | eritrócitos | Água residual da extração petróleo | hídrica | 8 e 30 dias | 50 e 10% respectivamente | (+) | Caliani <i>et al.</i> (2009) |
| <i>Anguilla Anguilla</i> | eritrócitos e hepatócitos | Sedimento e efluente tratado da indústria de papel e celulose e água do rio receptor | hídrica | 8, 16, 24 e 72 h | Fração solúvel do sedimento 2,5% (efluente tratado) 25 e 50% (água do rio) | (+) | Maria <i>et al.</i> (2003) |

Nota: I.P.: injeção intra-peritoneal/ (+): resposta positiva/ (-) resposta negativa/ D-R: dose-resposta/ D-T-R: dose-tempo-resposta.

Tabela 2. Biomonitoramentos realizados em diferentes localidades utilizando o ensaio cometa como indicador de genotoxicidade.

| Área de estudo | País | Principais contaminantes | Espécie | Tipo celular | Resposta | Referências |
|-----------------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------|----------|--------------------------------|
| Lago Igapó II | Brasil | Efluentes urbanos e industriais | <i>Tilapia rendalli</i> | eritrócitos | (+) | Lemos <i>et al.</i> (2005) |
| Porto de Göteborg | Suécia | Petróleo | <i>Zoarcas viviparus</i> | eritrócitos | (+) | Frenzilli <i>et al.</i> (2004) |
| Baía de Paranaguá | Brasil | Petróleo e metanol (Derramamento avaliado após 2 semanas) | <i>Cathorops spixii</i> | eritrócitos | (+) | Katsumiti <i>et al.</i> (2009) |
| Firth of Forth | Escócia | Efluente industrial | <i>Pholis gunnelus</i> | eritrócitos | (-) | Bombail <i>et al.</i> (2001) |
| Canal Oriental Inglês | França | Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) e Policlorobifenóis (PCBs) | <i>Limanda limanda</i> | eritrócitos | (+) | Akcha <i>et al.</i> (2003) |
| Rio São Joaquim | Estados Unidos da América | Lixiviação de resíduos agrícolas | <i>C. occidentalis</i> | eritrócitos | (+) | Whitehead <i>et al.</i> (2004) |
| Rios em Birmingham | Reino Unido | PAHs, PCBs e metais pesados | <i>Leuciscus cephalus</i> | hepatócitos | (+) | Winter <i>et al.</i> (2004) |
| Rio Sarno | Itália | Resíduos industriais, urbanos e agrícolas | <i>Gambusia holbrooki</i> | eritrócitos | (+) | Russo <i>et al.</i> (2004) |
| Lago Extremoz | Brasil | Resíduos industriais e urbanos, presença de metais pesados | <i>Oreochromis niloticus</i> | eritrócitos | (+) | Barbosa <i>et al.</i> (2010) |
| Três riachos na região nordeste do país | Alemanha | Resíduos industriais, urbanos e agrícolas | <i>Gasterosteus aculeatus</i> | eritrócitos | V.S. | Winzinger <i>et al.</i> (2007) |
| Lagoa dos Patos | Brasil | Efluentes industriais e urbanos | <i>Paralichthys orbignyanus</i> | eritrócitos | (-) | Amado <i>et al.</i> (2006) |

Nota: (+): resposta positiva/ (-) resposta negativa/ V.S.: variação sazonal.

1.5 Teste do micronúcleo

O teste do micronúcleo (MN) foi desenvolvido por Boller e Schmid (1970) em eritrócitos de medula óssea e sangue de hamster, atualmente é um ensaio *in vivo* amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos), e de agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (HAYASHI *et al.*, 1994), sendo a aplicação do teste em medula óssea e sangue periférico um dos mais estabelecidos ensaios citogenéticos *in vivo* no campo da genética toxicológica (FENECH, 2000).

A formação de micronúcleos (MN) ocorre nas células filhas em decorrência de danos induzidos nas células parentais, provenientes de fragmentos cromossômicos resultantes de quebras que não são incorporados no núcleo principal das células filhas após a mitose. Esses fragmentos são revestidos por membrana nuclear, ficando visível como um pequeno núcleo separado do núcleo principal da célula. Os MN podem também ser formados a partir de um cromossomo inteiro, quando ocorre dano no aparelho mitótico da célula, ou no próprio cromossomo. Nesta situação, o MN irá conter o centrômero do cromossomo, o qual pode ser detectado utilizando sondas específicas (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Os micronúcleos por serem detectados somente em células eucarióticas em divisão, dessa forma, o teste não pode ser aplicado eficientemente em populações de células que não estejam em divisão ou quando a cinética da divisão celular não é conhecida ou controlada (FENECH, 2000; AL-SABTI e METCALFE, 1995).

Nem todos os agentes que induzem micronúcleos são clastogênicos, micronúcleos podem surgir, por não-disjunção como um resultado de exposição a “veneno de fuso” (HEDDLE *et al.*, 1991). Apoptose induzida por produtos químicos tóxicos podem também produzir micro corpos nas células que lembram micronúcleos (HEDDLE *et al.*, 1991). No entanto, os mecanismos pelos quais os poluentes induzem MN e as interações em células de peixes não são totalmente compreendidas (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

O teste do micronúcleo é proposto para a verificação de alterações cromossômicas em substituição às técnicas citogenéticas convencionais de observações em metáfase, que necessitam de boas preparações, e requerem uma considerável experiência (HEDDLE, 1973).

Na citogenética clássica, cromossomos são estudados diretamente, sendo feita a observação e a contagem de aberrações nas metáfases. Apesar dessas técnicas fornecerem uma análise bastante detalhada, a complexidade e o trabalho laboratorial em classificar as aberrações e os problemas de artefatos ocasionados pela preparação das metáfases têm estimulado o desenvolvimento de sistemas mais simples de medir danos cromossômicos (FENECH, 2000).

Técnicas de análise de metáfases, que incluem a técnica de troca de cromátides irmãs (SCE) e aberrações cromossômicas não são ensaios práticos para muitas espécies de peixes em função de apresentarem cariótipos constituídos por grande número de cromossomos com tamanhos pequenos e formas irregulares (AL-SABTI e METCALFE, 1995). De acordo com Schmid (1975), em relação ao monitoramento de quebras cromossômicas, o teste do micronúcleo é tão sensível quanto o método de análise de metáfases, além disso, inclui efeitos no fuso mitótico. Todas estas características tornam o teste de MN altamente adequada para a rotina de monitoramento toxicológico.

O teste do micronúcleo foi adaptado para eritrócitos de peixes por Hooftman e de Raat (1982), os autores sugerem o uso do teste como uma alternativa à análise de aberrações cromossômicas e ressaltam que a uniformidade das células do sangue periférico torna a contagem de alterações morfológicas nucleares (AMN) viável.

Em peixes, diversos tipos de anomalias nucleares ainda não apresentam sua origem completamente compreendida. Carrasco, Tylbury e Myers (1990), descreveram e fotografaram as alterações morfológicas encontradas em núcleos de eritrócitos de peixes e classificaram como: blebbed; lobed; vacuolated e notched.

Essas anormalidades têm sido utilizadas por alguns autores como um indicativo do dano citogenético em espécies de peixes, os autores que descreveram essas alterações, não observaram uma associação significativa entre variações na morfologia do núcleo (incluindo micronúcleos) e os níveis de poluição química em sedimentos ou em tecidos de peixes, indicando uma fragilidade do uso do teste do micronúcleo em peixes. Sua possível falta de sensibilidade é devido à baixa e também variável frequência de micronúcleos em peixes, visto que a formação de MN em peixes pode ocorrer espontaneamente e à taxas menores do que em roedores (WILLIAMS e METCALF, 1992).

O uso do teste do micronúcleo utilizando a coloração com Giemsa é o método mais utilizado em peixes, porém não possibilita a diferenciação entre eritrócitos jovens e maduros. De acordo com Ueada *et al.* (1992), essa distinção não é importante para avaliar o efeito crônico dos contaminantes, no entanto, observar apenas eritrócitos jovens proporcionaria um sistema de ensaio mais sensível principalmente para avaliação de efeitos agudos, em função da cinética da formação dos micronúcleos.

A técnica de micronúcleo com coloração fluorescente de laranja de acridina é comumente aplicada em mamíferos, sendo modificada para peixes por Ueada *et al.* (1992) e possibilita a clara identificação de micronúcleos e a distinção de eritrócitos imaturos recém-formados, ou eritrócitos policromáticos (PCEs), permitindo obter resultados mais sensíveis, pela detecção de eritrócitos imaturos micronucleados que diferem de eritrócitos maduros ou normocromáticos (NCEs) cujo citoplasma não apresenta fluorescência. O eritrócito policromático tem um tempo de vida relativamente curto, de modo que qualquer micronúcleo que ele contenha deve ter sido gerado como resultado de danos cromossômicos induzidos recentemente (RIBEIRO *et al.*, 2003).

A técnica de MN com coloração fluorescente de laranja de acridina pode ser associada a uma análise da cinética eritrocitária, através da determinação da frequência de eritrócitos imaturos (%EI) em relação aos maduros. A redução na frequência de EI após exposição a um agente xenobiótico pode ser um indicativo de citotoxicidade induzida.

Muitos estudos têm verificado o aumento na frequência de MN em eritrócitos periféricos de peixes após exposição a diferentes contaminantes, tanto em condições de bioensaio (TABELA 3) quanto em biomonitoramento (TABELA 4).

Tabela 3. Bioensaios realizados com diferentes contaminantes utilizando o teste do micronúcleo como indicador de genotoxicidade.

| Espécie | Tipo celular | Contaminante | Via | Tempo | Concentração | Resposta | Referências |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|--------------------------------|
| <i>Heteropneustes fossilis</i> | eritrócitos | Pentaclorofenol (C_6HCl_5O) | hídrica | 48, 72, 96 h | 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 ppm | D-T-R | Ahmad <i>et al.</i> (2002) |
| <i>Garra rufa</i> | eritrócitos | Inseticida piretróide lambda-cialotrina | hídrica | 36 h | 0,005; 0,01 e 0,05 $\mu g.L^{-1}$ | (+) | Çavas e Ergene- Gözükar (2003) |
| <i>Danio rerio</i> | eritrócitos | Biocida triclosan | hídrica | 96 h | 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 e 0,9 $mg.L^{-1}$ | (-) | Oliveira <i>et al.</i> (2009) |
| <i>Hoplias malabaricus</i> | eritrócitos | Tributil estanho (TBT) e chumbo inorgânico (PbII) | trófica | 60 dias | 0,3 $\mu g.g^{-1}$ (TBT) 21,0 $\mu g.g^{-1}$ (PbII) | (+) | Ferraro <i>et al.</i> (2004) |
| <i>Carassius auratus gibelio</i> | eritrócitos, células branquiais e epiteliais | Cobre (Cu^{2+}), cádmio (Cd^{2+}), e hidrato de cloral (HC) | hídrica | 2 – 5 dias | 0,1 e 2,5 $mg.L^{-1}$ (Cu^{2+}) 0,005 e 1,0 $mg.L^{-1}$ (Cd^{2+}) 400 e 800 $mg.L^{-1}$ (HC) | (+) | Arkhipchuk e Garanko (2005) |
| <i>Cyprinus carpio</i> , <i>Carassius gibelio</i> e <i>Corydoras paleatus</i> | eritrócitos, células branquiais e hepatócitos | Cloreto de cádmio ($CdCl_2$) e sulfato de cobre ($CuSO_4$) | hídrica | 21 dias | 0.005 e 0.1 $mg.L^{-1}$ ($CdCl_2$) 0.01–0.25 $mg.L^{-1}$ ($CuSO_4$) | (+) | Çavas <i>et al.</i> (2005) |
| <i>Oreochromis niloticus</i> | eritrócitos | Metronidazol | hídrica | 24, 48, 72 h. | 5, 10, 15 $mg.L^{-1}$ | D-T-R | Çavas e Ergene-Gözükar (2005a) |
| <i>Scophthalmus maximus</i> e <i>Gadus morua</i> | eritrócitos do sangue e do rim cefálico | Petróleo bruto e nonilfenol | hídrica | 3 semanas | 0,5 ppm (petróleo) 30 ppm (nonilfenol) | (+) | Barsiene <i>et al.</i> (2006) |
| <i>Scophthalmus maximus</i> | eritrócitos | Dialquila ftalato, bisfenol A, Éter tetrabromodifenílico, Nonifenol | hídrica | 3 semanas | 50 ppb | (+) | Bolognesi <i>et al.</i> (2006) |
| <i>Piaractus</i> | eritrócitos | Herbicida atrazina | hídrica | 96 horas | 0,1 $mg.L^{-1}$ | (+) | Moron <i>et al.</i> (2006) |

mesopotamicus

| | | | | | | | |
|------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------|---------|--------------------------|-------------------------------------|-------|--------------------------------|
| <i>Prochilodus lineatus</i> | eritrócitos | Fração hidrossolúvel de óleo diesel | hídrica | 6, 24, 96 h e 15 dias | 50% | (+) | Vanzella <i>et al.</i> (2007) |
| <i>Orthrias angorae</i> | eritrócitos | Hipoclorito de sódio (NaOCl) | hídrica | 36, 72h e 6 dias | 0,25; 0,37; 0,50 mg.L ⁻¹ | D-T-R | Gül <i>et al.</i> (2008) |
| <i>Hoplias malabaricus</i> | eritrócitos e células renais | Chumbo Inorgânico (PbII) | I.P. | 96 h | 7, 21, 63 e 100 µg.g ⁻¹ | (-) | Ramsdorf <i>et al.</i> (2008) |
| <i>Gambusia affinis</i> | eritrócitos | Água residual da extração petróleo | hídrica | 8 e 30 dias | 50 e 10% respectivamente | (+) | Caliani <i>et al.</i> (2009) |
| <i>Carassius carassius</i> | eritrócitos | Ciclofosfamida monihidratada | hídrica | 2, 4 e 6 dias | 5 mg.L ⁻¹ | (+) | Polard <i>et al.</i> (2011) |
| <i>Oreochromis niloticus</i> | eritrócitos e células branquiais | Efluentes da indústria têxtil | hídrica | 5, 10 e 20% | 3, 6 e 9 dias | D-R | Çavas e Ergene- Gözükar (2003) |
| <i>Oreochromis niloticus</i> | eritrócitos, células branquiais e epiteliais | Efluentes industriais e urbanos | hídrica | Amostras do rio receptor | 2, 4 e 6 dias | (+) | Ergene <i>et al.</i> (2007a) |

Nota: I.P.: injeção intra-peritonal/ (+): resposta positiva/ (-) resposta negativa/ D-R: dose-resposta/ D-T-R: dose-tempo-resposta.

Tabela 4. Biomonitoramentos realizados em diferentes localidades utilizando o teste do micronúcleo como indicador de genotoxicidade.

| Área de estudo | País | Principais contaminantes | Espécie | Tipo celular | Resposta | Referências |
|----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-------------|---------------------------------|
| Regiões costeiras do Mar Vermelho, Mediterrâneo e Mar do Norte da Alemanha | Oceano Atlântico (Mar Vermelho e Mar do Norte), Oceano Índico (Mar Vermelho) | Instalações portuárias, piscicultura, efluentes industriais e urbanos | <i>Limanda limanda</i> e <i>Platichthys flesus</i> | eritrócitos | (+) | Bresler (1999) |
| Lago Shitovskoe | Rússia | Área de referência | <i>Abramis brama</i> , <i>Perca fluviatilis</i> , <i>Rutilus rutilus</i> e <i>Esox lucius</i> | eritrócitos | (-) | Lugas'kova (2002) |
| Ria de Aveiro | Portugal | Efluentes industriais e urbanos | <i>Liza aurata</i> , <i>Liza ramada</i> e <i>Liza saliens</i> | eritrócitos | (+) | Pacheco <i>et al.</i> (2005) |
| Rio Madeira e Rio Solimões | Brasil | Mercúrio | <i>Prochilodus nigricans</i> , <i>Mylossoma duriventris</i> e <i>Hoplias malabaricus</i> | eritrócitos | (+) | Porto <i>et al.</i> (2005) |
| Lagoa dos Patos | Brasil | Efluentes industriais e urbanos | <i>Paralichthys orbignyanus</i> | eritrócitos | V.S. | Amado <i>et al.</i> (2006) |
| Costa Mediterrânea | Turquia | Instalações portuárias e efluentes industriais | <i>Mugil cephalus</i> | eritrócitos e células branquiais | (+) V.S. | Çavas e Ergene-Gözükara (2005b) |
| Goksu Delta | Turquia | Resíduos agrícolas e efluentes urbanos | <i>Clarias gariepinus</i> , <i>Alburnus orontis</i> e <i>Mugil cephalus</i> | eritrócitos | (+) | Ergene <i>et al.</i> (2007b) |
| King George Island | Antártica | Combustíveis e efluentes de laboratório | <i>Trematomus newnesi</i> | eritrócitos | (+) | Ngan <i>et al.</i> (2007) |
| Bacia hidrográfica do rio Iraí e bacia hidrográfica do Iguaçu | Brasil | Resíduos agrícolas e área de referência respectivamente | <i>Astyanax sp B</i> e <i>A. altiparanae</i> | eritrócitos hepatócitos e células renais | (+) | Ramsdorf (2007) |

| | | | | | | |
|----------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------|------|---------------------------------------|
| Mar da Ligúria | Noroeste do Mediterrâneo | Petróleo (Derramamento avaliado após 6 anos) | <i>Boops boops</i> , <i>Mullus barbatus</i> e <i>Uranoscopus scaber</i> | eritrócitos | (-) | Viarengo <i>et al.</i> (2007) |
| Baía de Paranaguá | Brasil | Petróleo e metanol (Derramamento avaliado após 2 semanas) | <i>Cathorops spixii</i> | eritrócitos | (+) | Katsumiti <i>et al.</i> (2008) |
| Rio Buyuk Menderes | Turquia | Metais pesados | <i>Chondrostoma nasus</i> e <i>Barbus capito pectoralis</i> | eritrócitos | (-) | Koca <i>et al.</i> (2008) |
| Sul do Mar Adriático | Croácia | Área de referência | <i>Sparus aurata</i> . | eritrócitos | V.S. | Strunjak-Perovic <i>et al.</i> (2009) |

Nota: (+): resposta positiva/ (-) resposta negativa/ V.S.: variação sazonal.

1.6 Espécie bioindicadora: *Astyanax altiparanae* (Characidae)

FILO – Chordata
 SUBFILO – Vertebrata
 SUPERCLASSE – Pisces
 CLASSE – Osteichthyes
 SUBCLASSE – Actinopterygii
 INFRACLASSE – Teleostei
 SUPERORDEM – Osthariophysi
 SÉRIE – Otophysi
 SUBSÉRIE – Characiphysi
 ORDEM – Characiformes
 FAMÍLIA – Characidae
 SUBFAMÍLIA - Tetragonopterinae
 GÊNERO – *Astyanax*
 ESPÉCIE: *Astyanax altiparanae*

O uso de peixes como bioindicadores dos efeitos da poluição é de grande importância e permite a detecção precoce de problemas ambientais (FRENZILI *et al*, 2004). Em relação a outros grupos de organismos utilizados em estudos ecotoxicológicos, os peixes apresentam várias vantagens: representam o maior e mais diverso grupo entre os vertebrados (POWERS, 1989); com respostas de alta relevância ecológica à exposição a agentes tóxicos (VAN der OOST e BEYER, 2003); e usualmente de forma semelhante a outros vertebrados, inclusive humanos (AL-SABTI e METCALFE, 1995); acumulam substâncias tóxicas; respondem a baixas concentrações de mutágenos; formam diversos elos na rede trófica (ÇAVAS e ERGENE-GÖZÜKARA, 2005); podem ser utilizados *in vivo*, em bioensaios e biomonitoramento e ainda representam uma importante fonte de proteína para as populações humanas (ODUM, 1988; CAMARGO e POUEY, 2005; FAO, 2010)

A espécie *Astyanax altiparanae* foi proposta como organismo bioindicador no presente estudo por ser um peixe nativo que apresenta ampla distribuição geográfica, importância ecológica, valor econômico e por se enquadrar nos critérios estabelecidos por Sanchez-Galan *et al.* (1999) de características que o organismo sentinela deve apresentar em estudos de genotoxicidade ambiental. As características são: a espécie deve ser difundida em diferentes ecossistemas,

cosmopolita; suficientemente sensível para a detecção de genotoxicidade; deve ser adequada para as condições de cultivo e possuir grandes populações naturais.

A. altiparanae pertence à ordem Characiformes, grupo dominante dentre os peixes de água doce da América do Sul e à família Characidae, a maior e a mais complexa desta ordem (BRITSKI *et al.*, 2007), engloba a maior parte dos peixes brasileiros de água doce, incluindo também a grande maioria dos peixes de escama (BRITSKI, 1972). Na América do Sul essa família compreende cerca de 30 subfamílias e aproximadamente 250 gêneros, incluindo peixes de hábitos alimentares diversificados (herbívoros, onívoros, carnívoros) e que ocupam uma grande variedade de habitats (BRITSKI, 1972).

A subfamília Tetragonopterinae representa o maior número de espécies no Brasil, sendo conhecida pelo fato de nela estarem incluídos os peixes vulgarmente chamados de lambaris. Essa subfamília está representada por toda a América do Sul e Central, estendendo-se da fronteira do México com os Estados Unidos até a Argentina (BRITSKI, 1972).

A classificação dos seus representantes baseia-se na dentição, que é caracterizada pela presença de dentes cuspidados, organizados em duas ou três séries no pré-maxilar e em uma única série na mandíbula (BRITSKI, 1972). As espécies de Tetragonopterinae, cujo hábito alimentar predominante é o onívoro, vivem em uma grande variedade de ambientes (BRITSKI *et al.*, 1984).

Devido ao fato da subfamília Tetragonopterinae apresentar uma enorme diversidade morfológica e específica, tem sido cada vez mais aceita a idéia de que esta não representa um agrupamento natural monofilético, mas parafilético (WEITZMAN e MALABARBA, 1998).

O gênero *Astyanax* foi proposto por Bair e Girard (1854) apud EIGENMANN (1917) e é considerado o mais representativo da subfamília Tetragonopterinae, sendo um dos gêneros dominantes na América do Sul (EIGENMANN, 1921). Esse gênero apresenta distribuição geográfica ampla na região Neotropical, sendo abundante nas bacias hidrográficas brasileiras, constituindo aproximadamente uma centena de espécies e subespécies nominais (GARUTTI e BRITSKI, 2000). Inclui peixes de pequeno porte, até 200 mm, comuns nas bacias hidrográficas neotropicais.

Uma ampla revisão taxonômica para o gênero foi apresentada por Eigenmann (1921 e 1927), posteriormente não foram feitas revisões, mas

publicações que se referem à descrição de novas espécies. O trabalho mais recente e que inclui *Astyanax* é o de Géry (1977), que segue fundamentalmente Eigenmann (*op. cit.*). Na literatura constam cerca de uma centena de espécies nominais atribuídas ao gênero *Astyanax* (GARUTTI, 1999).

Garutti (1995) fez uma revisão do gênero *Astyanax* nas bacias hidrográficas do Alto Rio Paraná, Rio São Francisco e Rio Amazonas. Nesse estudo, o autor assumiu que espécimes da região do Alto Rio Paraná, anteriormente identificados como *Astyanax bimaculatus* (LINNAEUS, 1758), pertenciam uma espécie nova, que posteriormente foi descrita por Garutti e Britski (2000) como *Astyanax altiparanae*. Na bacia hidrográfica do rio Iguaçu os espécimes também chamados de *A. bimaculatus* foram identificados como *A. altiparanae* por DA GRAÇA e PAVANELLI (2000), desta forma, ampliando a distribuição geográfica da espécie.

Astyanax altiparanae caracteriza-se por apresentar o corpo prateado, com a região ventral esbranquiçada e a região dorsal cinzenta, as nadadeiras caudal, anal e pélvicas são amareladas enquanto as demais são hialinas ou levemente amareladas. Na caudal, ainda, há uma faixa mediana negra estendida à extremidade dos raios medianos, separando os lobos superior e inferior. Acima da pupila, há uma mancha amarelo-ferrugem (GARUTTI e BRITSKI, 2000) (FIGURA 1.).

Figura 1. Exemplar de *Astyanax altiparanae* (Characidae).



A espécie é popularmente conhecida como lambari-tambiú, lambari-de-rabo-amarelo ou lambari-relógio, sendo encontrada principalmente na bacia do Rio Paraná, e também nas bacias do Rio Iguaçu, Rio Paranapanema e Rio Tibagi, sendo uma espécie restrita ao sudeste do Brasil.

Prioli (2001), utilizando marcadores RAPD (amplificação aleatória de DNA polimórfico), confirmou a presença de *A. altiparanae* na bacia hidrográfica do Rio

Iguaçu e verificou a alta diversidade genética intrapopulacional da espécie. Neste estudo, o autor sugere algumas hipóteses para explicar a existência de *A. altiparanae* na região, como a introdução antrópica ou a existência de um ancestral comum, no entanto, nada conclusivo.

Leuzzi *et al.* (2004) ao utilizarem marcadores RAPD também verificaram alta variabilidade da estrutura genética de *A. altiparanae* (estimada em cerca de 70%) entre os trechos superior, médio e baixo da bacia hidrográfica do Rio Paranapanema. De acordo com Carvalho (1993), a diversidade genética, expressa dentro e entre as populações, pode favorecer a adaptação a um determinado habitat e também expandir a fronteira de colonização e de distribuição, permitindo a sobrevivência em uma ampla variedade de condições.

Astyanax altiparanae exibe versatilidade ecológica, com capacidade de ajuste a diversas situações ambientais e grande capacidade adaptativa exploratória, que utiliza estratégias diferenciadas na estrutura populacional (ORSI *et al.*, 2004). Suzuki e Orsi (2008) observaram a formação de cardumes com organização e localização diferenciadas dependendo do tipo de atividade realizada, como frequência de deslocamento e forrageamento, este comportamento também evidencia uma tática anti-predatória.

A espécie coloniza diversos habitats de água doce, lóticos e lênticos, incluindo alguns que estão parcialmente degradados (ORSI *et al.*, 2002).

Esta espécie também apresenta uma dieta onívora, com variação dos itens alimentares de acordo com a disponibilidade de recursos (GOMIERO e BRAGA, 2003), desta forma, a grande flexibilidade em seus hábitos alimentares, sugere a possibilidade de exploração de microhabitats variados (ORSI, 2001).

A. altiparanae representa um importante elo da cadeia alimentar, constituindo uma parte significativa da dieta de diversos peixes (LEUZZI *et al.*, 2004; BERNNEMANN e SHIBATTA, 2002), sendo também consumida por seres humanos (MEURER *et al.*, 2005;).

2 JUSTIFICATIVA

Devido ao grande volume, variedade e reconhecido potencial tóxico dos efluentes que são lançados no ambiente aquático, torna-se necessário avaliar os impactos causados sobre a saúde dos ecossistemas utilizando biomarcadores sensíveis e de alta relevância ecológica, como de genotoxicidade e citotoxicidade em espécies nativas. Sendo importante considerar, não apenas a análise dos efluentes *in natura*, mas também o efluente tratado, a fim de determinar a eficiência do sistema de tratamento e mensurar possíveis interações tóxicas geradas no próprio sistema. Vale salientar que são escassos na literatura estudos ecotoxicológicos de efluentes gerados em instituições de ensino e pesquisa, e que o gerenciamento desses resíduos é muitas vezes inadequado e pouco fiscalizado por órgãos ambientais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos genotóxicos dos efluentes químicos pré e pós-tratamento, provenientes dos laboratórios do Departamento de Engenharia Química e do Laboratório de Análise de Combustíveis Automotivos (LACAUT) da Universidade Federal do Paraná.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade aguda dos efluentes químicos pré e pós-tratamento na espécie *Astyanax altiparanae*;
- Verificar o efeito genotóxico dos efluentes químicos pré e pós-tratamento na espécie *Astyanax altiparanae* através dos biomarcadores ensaio cometa em eritrócitos e células brânquiais e teste do micronúcleo (MN) e alterações morfológicas nucleares (AMN) em eritrócitos;
- Avaliar interações com o processo de eritropoiese através da análise da frequência de eritrócitos imaturos;
- Realizar a caracterização físico-química dos efluentes *in natura* e tratado;
- Determinar se o sistema de tratamento é eficaz na remoção de substâncias genotóxicas.

REFERÊNCIAS

AHMAD, W.; NIAMAT ALI, M.; ABUL FARAH BUSHRA ATEEQ, M. Computerized automated morphometric assay including frequency estimation of pentachlorophenol induced nuclear anomalies (micronucleus) in catfish *Heteropneustes fossilis*. **Chromosoma**, v. 110, p. 570-574, 2002.

AKCHA, F.; LEDAY, G.; PFOHL-LESZKOWICZ, A. Measurement of DNA adducts and strand breaks in dab (*Limanda limanda*) collected in the field: effects of biotic (age, sex) and abiotic (sampling site and period) factors on the extent of DNA damage. **Mutation Research**, v. 552, p. 197-207, 2004.

ALCARAZ, G. Relevant stress indices in aquatic ecotoxicology. **Revista internacional de contaminación ambiental**, v. 16, p. 75-81, 2000.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v. 343, p. 121-135, 1995.

AMADO, L. L., ROBALDO, R. B., GERACITANO, L., MONSERRAT, J. M., BIANCHINI, A. Biomarkers of exposure and effect in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, p. 207-213, 2006.

ARKHIPCHUK, V. V., GARANKO, N. N. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on *in vivo* fish fin cells. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 62, p. 42-52, 2005.

ASSIS, J. C. Água sob medida. Agroanalysis. v. 18, 83-8, 1998. In: MORAES, D. S. L.; JORDÃO, B. Q. **Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana**. Revista de Saúde Pública, v. 36, p. 370-374, 2002.

BANNI, M.; BOURAOU, Z.; GHEDIRA, J.; CLERANDEAU, C.; GUERBEIJ.; NARBONNE, J. F.; BOUSSETTA, H. Acute effects of benzo[a]pyrene on liver phase I and II enzymes, and DNA damage on sea bream *Sparus aurata*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.35, p.293, 2009.

BARBOSA, J. S.; CABRAL, T. M.; FERREIRA, D. N. AGNEZ-LIMA, L. F.; MEDEIROS, S.R. B. DE. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 320-325, 2010.

BARRETO, R. E.; GONTIJO, A. M. M. C.; ALVES-DELIMA, R.O.; RAYMUNDI, V. C.; PINHAL, D.; REYES, V.A.V.; VOLPATO, G. L.; SALVADORI, D. M. F. MS222 does not induce primary DNA damage in fish. **Aquaculture International**, v. 15, p. 163-168, 2007.

BARSIENE, J.; DEDONYTE, V.; RYBAKOVAS, A.; ANDREIKENAITE, L.; ANDERSEN, O. K. Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. **Aquatic Toxicology**, v. 78S, p. 99-104, 2006.

BAUMAN, P. C. Epizootics of cancer in fish associated with genotoxins in sediment and water. **Mutation Research**, v. 411, p. 227-233, 1998.

BAUMANN, P. C.; HARSHBARGER, J. C. Decline in liver neoplasms in wild brown bullhead catfish after coking plant closes and environmental PAHs plummet. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, p. 168-170, 1995.

BENNEMANN, S. T.; SHIBATTA, O. A. Dinâmica de uma assembléia de peixes do rio Tibagi, p. 433-442. In: MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J. A. (Eds). **A Bacia do rio Tibagi**. Londrina, ED. UEL, 595p., 2002.

BERTOLETTI, E. **Estimativa de efeitos tóxicos crônicos com *Danio rerio* (Pisces: Cyprinidae)**. 117 p. Tese (Doutorado em Saúde Ambiental) - Faculdade de Saúde Pública, São Paulo, 2000.

BICKHAM, J. W.; SMOLEN, M. J. Somatic and heritable effects of environmental genotoxins and the emergence of evolutionary toxicology. **Environmental Health Perspectives**, v. 12, p. 25-28, 1994.

BOLLER, K.; SCHMID, W. Chemische Mutagenese beim Sauger. Das Knochenmark des Chinesischen Hamsters als *in vivo*-Test system. Hamatologische Befunde nach Behandlung mit Trenimon. **Humangenetik**, v. 2, p. 35-54, 1970.

BOLOGNESI, C., et al. Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. **Science of the Total Environment**, v. 333, p. 127-136, 2004.

BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v. 44, p. 383-392, 2001.

BRESLER, V.; BISSINGER, V.; ABELSON, A.; DIZER, H.; STURM, A.; KRATKE, R.; FISHELSON, L.; P. HANSEN. Marine molluscs and fish as biomarkers of pollution stress in littoral regions of the Red Sea, Mediterranean Sea and North Sea. **Helgoland Marine Research**, v. 53, p. 219–243, 1999.

BRITSKI, H. A. Peixes de água doce do Estado de São Paulo: Sistemática. In: **Poluição e Piscicultura**. Faculdade de Saúde Pública da USP, Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria da Agricultura, São Paulo, p.79-108, 1972.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para peixes da bacia do São Francisco)**. Câmara dos Deputados, Brasília, 143 p., 1984.

BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. **Peixes do Pantanal: manual de identificação**. Brasília: EMBRAPA, 2 ed., 227 p., 2007.

BROUWER, A.; MURK, A. J.; KOEMAN, J. H. Biochemical and physiological approaches in ecotoxicology. **Functional Ecology**, v. 4, p. 275-281, 1990.

CALIANI, I.; PORCELLONI, S.; MORI, G.; FRENZILLI, G.; FERRARO, M.; MARSILI, L.; CASINI, S.; FOSSI, M.C. Genotoxic effects of produced waters in mosquito fish (*Gambusia affinis*). **Ecotoxicology**, v. 18, p. 75-80, 2009.

CAMARGO, S. G. O. de.; POUEY, J. L. O. F. Aquicultura: um mercado em expansão. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 11, p. 393-396, 2005.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as an *in situ* biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, p. 2123 -2136, 1990.

CARTER, K. B. Controlling Toxicity: An Integrated Strategy. **Journal of the Water Pollution Control Federation**, v. 58, p. 6-11, 1986.

CARVALHO, G. R. Evolutionary aspects of fish distribution: Genetic variability and adaptation. **Journal of Fish Biology**, v. 43, p. 53-73, 1993.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GOZUKARA, S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. **Mutation Research**, v. 538, p. 81-91, 2003.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GOZUKARA, S. Micronucleus test in fish cells: a bioassay for *in situ* monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 46, p. 64-70, 2005b.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GOZUKARA, S. Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells. **Mutation Research**, v. 534, p.93-99, 2003.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GOZUKARA, S. Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine orange fluorescent staining. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, p. 107-111, 2005a.

ÇAVAS, T.; GARANKO, N. N.; ARKHIPCHUK, V. V. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 569-574, 2005.

CESTARI, M. M.; LEMOS, P. M. M.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; COSTA, J. R. M A.; PELLETIER, E.; FERRARO, M. V. M.; MANTOVANI, M. S.; FENOCCHIO, A. S. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 270-274, 2004.

CETESB: COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. São Paulo: CETESB, 17p., 1990.

CLARK, G. M. The genetic basis of developmental stability. I. Relationship between stability, heterozygosity and genomic coadaptation. **Genetica**, v. 89, p. 15-23, 1993.

COLLINS, A. R. The Comet assay for DNA damage and repair principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v.26, p. 249-60, 2004.

CONNELL, D.; LAM, P.; RICHARDSON, B.; WU, R. (Eds): **Introduction to Ecotoxicology**. Blackwell Science, Oxford, Reino Unido. 165p.,1999.

CONSEMA: CONSELHO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução n º 129, de novembro de 2006 - **Critérios e padrões de emissão para toxicidade de efluentes Líquidos lançados em águas superficiais do Estado do Rio Grande do Sul**.

DA GRAÇA, W. J.; PAVANELLI, C. S. **Astyanax altiparanae** Garutti & Britski, 2000 (Osteichthyes, Characidae) in the Iguaçu River basin. **Acta Scientiarum**, v. 24, p. 451-453, 2002.

DE ANDRADE, V. M. de; FREITAS, T. R. O. de; SILVA, J. da. Comet assay using mullet (*Mugil* sp.) and sea catfish (*Netuma* sp.) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. **Mutation Research**, v. 560, p. 57-67, 2004.

DE FLORA, S.; BAGNASCO, M.; ZANACCHI, P. Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazard in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. **Mutation Research**, v. 258, p. 285-320, 1991.

DECAPRIO, A. P. Biomarkers: Coming of age for environmental health and risk assessment. **Environmental Science Technology**, v. 31, p. 1837-1848, 1997.

DEGUCHI, Y.; TOYOIZUMI, T.; MASUDA, S.; YASUHARA, A.; MOHRI, S.; YAMADA, M.; INOUE, Y.; KINAE, N. Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish. **Mutation Research**, v. 627, p. 178-185, 2007.

DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, p. 5-32, 2009.

EIGENMANN, C.H. The American Characidae. **Memoirs Museum of Comparative Zoology**, Vol. XLIII. Part 1. CAMBRIDGE, U. S. A.: Printed for the museum, 558 p., 1917.

EIGENMANN, C.H. The American Characidae. **Memoirs Museum of Comparative Zoology**, v. 43, p. 209-310, 1921.

EIGENMANN, C.H. The American Characidae. **Memoirs Museum of Comparative Zoology**, v. 43, p. 311-428, 1927.

ELLIOTT, J.; BISHOP, C.; MORRISSEY, C. (Eds.) **Wildlife Ecotoxicology**. Series: Emerging Topics in Ecotoxicology, v. 4, Hardcover, 2011. Disponível em: <<http://www.springer.com/series/7360?detailsPage=titles>> Acesso em: 01 de outubro de 2010.

ERGENE, S.; ÇAVAS, T.; ÇELİK, A.; KÖLELİ, N.; AYMAK, C. Evaluation of river water genotoxicity using the piscine micronucleus test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 48, Issue 6, p. 421-429, 2007a.

ERGENE, S.; ÇAVAS, T.; ÇELİK, A.; KÖLELİ, N.; KAYA, F.; KARAHAN, A. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. **Ecotoxicology**, v. 16, p. 385-391, 2007b.

ESPÍNDOLA, E. L. G.; BRIGANTE, J. (Eds.) **Limnologia fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu**. São Carlos: Rima, 278 p., 2003.

FABACHER, D. L.; BESSER, J. M.; SCHMITT, C. J.; HARAHBARGAR, J. C.; PETERMAN, P. H.; LEBO, J. A. Contaminated sediments from tributaries of the Great Lakes: chemical characterization and carcinogenic effects in Medaka (*Oryzias latipes*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 20, p. 17-34, 1991.

FAO: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2010**. FAO: Rome, 197p., 2010.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FERRARO, M. V. M.; FENOCCHIO, S.; MANTOVANI, M. S.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A.; CESTARI, M. M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 103-107, 2004.

FITZHUGH, T. W.; RICHTER, B. D. Quentin urban thirst: growing cities and their impacts on freshwater ecosystems. **BioScience**, v. 54, p. 741-754, 2004.

FOLMAR, L. C.; GARDNER, G. R.; HICKEY, J.; BONOMELLI, S.; MOODY, T. Serum chemistry and histopathological evaluations of brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*) from Buffalo and Niagara Rivers, New York. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 25, p. 298-303, 1993.

FRACÁCIO, R.; VERANI, N. F.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; ROCHA, O.; SÁ, O. R.; ANDRADE, C. A. Alteration on growth and gill morphology of *Danio rerio* (Pisces, Ciprinidae) exposed to the toxic sediment. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, p. 685-695, 2003.

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research**, v. 681, p. 80-92, 2009.

FRENZILLI, G.; SCARCELLI, V.; BARGA, I. DEL.; NIGRO, M.; FORLIN, L.; BOLOGNESI, C.; STURVE, J. DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Goteborg harbour, **Mutation Research**, v. 552, p. 187-195, 2004.

GARUTTI, V. **Revisão taxonômica dos *Astyanax* (Pisces, Characidae), com mancha umeral ovalada e mancha no pedúnculo caudal, estendendo-se à extremidade dos raios caudais medianos, das bacias do Paraná, São Francisco e Amazônica**. Tese (Doutorado, Livre-Docência) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 1995.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H. A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciência e Tecnologia**, PUCRS, Série Zoologia, Porto Alegre, v. 13, p. 65-88, 2000.

GARUTTI, V. Descrição de *Astyanax argyrimarginatus* sp. n. (Characiformes, Characidae) procedente da bacia do rio Araguaia, Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59, p. 585-591, 1999.

GEDIK, C.; EWEN, S.; COLLINS, A. Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. **International Journal of Radiation Biology**, v. 62, p. 313-20, 1992.

GÉRY, J. **Characoids of the world**. Neptune City: T. F. H. Publ., 1977.

GIESY, J. P.; HOKE, R. A. Freshwater sediment toxicity bioassessment: rationale for species selection and test design. **Journal of Great Lakes Research**, v. 15, p. 539-569, 1989.

GOLDSTEIN, E. G. Testes de toxicidade de efluentes industriais. **Revista Ambiente**, v. 2, p. 33-38, 1988.

GOMIERO, L. M.; BRAGA, F. M. de S. O lambari *Astyanax altiparanae* (Characidae) pode ser um dispersor de sementes? **Acta Scientiarum**, v. 25, p. 353-360, 2003.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p. 173-200.

GÜL, S.; ÖZKAN, O.; NUR, G.; AKSU, P. Genotoxic effects and LC50 value of NaOCl on *Orthrias angorae* (Steindachner 1897). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 80, p. 544-548, 2008.

HANDY, R. D. Intermittent exposure to aquatic pollutants: assessment, toxicity and sublethal responses in fish and invertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 107, p. 171-184, 1994.

HAYASHI, M.; MAcGREGOR, J. T.; GATEHOUSE, D. G.; ADLER, I. D.; BLAKEY, D. H.; DERTINGER, S. D.; KRISHNA, G.; MORITA, T. RUSSO, A.; SUTOU, S. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 312, p. 293–304, 1994.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research**, v. 18, p.187-190, 1973.

HEDDLE, J.A., CIMINO, M.C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHELBY, M.D.; TUCKER, J. D.; VANPRAYS, Ph.; MACGREGOR, J. T. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 18, p. 277-291, 1991.

HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A. BURTON Jr., G. A. CAIRNS Jr., J. **Handbook of Ecotoxicology**. Lewis Publishers. Boca Raton. 755p., 1995.

HOOFTMAN, R. N.; de RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research**, v. 104, p.147-152, 1982.

HUGGETT, R. J., KIMERLE, R. A., MEHRLE, P. M., JR.; BERGMAN, H. L. (Eds.), **Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histopathological Markers of Anthropogenic Stress**. Lewis, Boca Raton, FL, p. 155–210, 1992.

JHA, A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, p. 207-221, 2008.

KATSUMITI, A.; Valdez Domingos, F. X.; AZEVEDO, M.; DA SILVA, M. D.; DAMIAN, R. C.; ALMEIDA, M. I. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; CESTARI, M. M.; RANDI, M. A. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; FREIRE, A. A. An assessment of acute biomarker responses in the demersal catfish *Cathorops spixii* after the Vicuña Oil Spill in a harbour estuarine area in Southern Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 152, p. 209-22, 2009.

KENDALL, R. J.; LACHER, T. E. Jr. (Eds.): **Wildlife Toxicology and Population Modeling**, Integrated Studies of Agroecosystems. Chelsea, MI: Lewis, 1994.

KENDALL, R. J. Farming with agrochemicals: the response of wildlife. **Environmental Science and Technology**, v. 26, p. 238-245, 1992.

KENDALL, R. J.; ANDERSON, T. A.; BAKER, R. J.; BENS, C. M.; CARR, J. A.; CHIODO, L. A.; COBB III, G. P.; DICKERSON, R. L.; DIXON, K. R.; FRAME, L. T.; HOOPER, M. J.; MARTIN, C. F.; McMURRY, S. T.; PATINO, R.; SMITH, E. E.; THEODORAKIS, C. W. **Ecotoxicology**. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. 6. ed., KLAASSEN, C. D. (Ed.). McGraw-Hill, 1236p., 2001.

KOCA, S.; KOCA, Y. B.; YILDIZ, S.; GÜRCÜ, B. Genotoxic and histopathological effects of water pollution on two fish species, *Barbus capito pectoralis* and *Chondrostoma nasus* in the Büyük Menderes River, Turkey. **Biological Trace Element Research**, v. 122, p. 276–291, 2008.

KUMARAVEL, T. S.; JHA, A. N. Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. **Mutation Research**, v. 605, p. 7-16, 2006.

KUMARAVEL, T. S.; VILHAR, B.; FAUX, S. P.; JHA, A. N. Comet assay measurements: a perspective. *Cell Biol. Toxicology*, v. 25, p. 43-54, 2007.

KURELEC, B. The genotoxic disease syndrome. **Marine Environmental Research**, v. 35, p. 341-348, 1993.

LAITANO, K. dos S.; MATIAS, W. G. Testes de Toxicidade com *Daphnia magna*: Uma Ferramenta para Avaliação de um Reator Experimental UASB. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 1, p. 43-47, 2006.

LEMOES, N. G.; DIAS, A.L.; SILVA-SOUZA, A. T.; MANTOVANI, M. S. Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, p. 197–201, 2005.

LEUZZI, M. S. P.; ALMEIDA, F. S. de; ORSI, M. L.; SODRÉ, L. M. K. Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27 p. 355-362, 2004.

LIMA, P. L.; BENASSI, J. C.; PEDROSA, R. C.; DAL MAGRO, J.; OLIVEIRA, T. B.; WILHELM FILHO, D. Time-course variations of DNA damage and biomarkers of oxidative stress in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to effluents from a swine industry. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 50, p. 23–30, 2006.

LUGAS'KOVA, N. V. Species specificity of the cytogenetic stability of fish in a eutrophic water body. **Russian Journal of Ecology**, v. 34, p. 210–214, 2003.

MARIA, V. L.; CORREIA, A. C.; SANTOS, M. A. Genotoxic and hepatic biotransformation responses induced by the overflow of pulp mill and secondary-treated effluents on *Anguilla anguilla* L., *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 55, p. 126-137, 2003.

METCALFE, L.; EDDY, H. P. **Wastewater engineering treatment in reuse**. 4.ed. McGraw Hill: Boston, 1334 p., 2003.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R.; KAVATA, L. B.; LACERDA, C. H. F. Nível de arraçoamento para alevinos de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax bimaculatus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p.1835-1840, 2005.

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**, v. 399, p. 135-147, 1998.

MORAES, D. S. L.; JORDÃO, B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, p. 370-374, 2002.

MORIARTY, F. **Ecotoxicology: the study of pollutants in ecosystems**. London: Academic Press, 3. ed., 347 p., 1999.

MORON, S. E.; POLEZ, V. L. P.; ARTONI, R. F.; RIBAS, J. L. C.; TAKAHASHI, H. K. Estudo de Alterações na concentração dos íons plasmáticos e da indução de micronúcleos em *Piaractus mesopotamicus* exposto ao herbicida Atrazina. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 1, p. 27-30, 2006.

MYERS, M. S., LANDAHL, J. T., KRAHN, M. M.; MCCAIN, B. B. Relationships between hepatic neoplasms and related lesions and exposure to toxic chemicals in marine fish from the U.S. West Coast. **Environmental Health Perspectives**, v. 90, p. 17-26, 1991.

NACCI, D. E.; CAYULA, S.; JACKIM, E. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. **Aquatic Toxicology**, v. 35, p. 197-210, 1996.

NGAN, P. V. et al. Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus and erythrocyte nuclear abnormalities assay) of the Admiralty Bay water surrounding the Brazilian Antarctic Research Station “Comandante Ferraz,” King George Island. **Polar Biology**, v. 30, p. 209–217, 2007.

NEWMAN, 1996. In: NEWMAN, M., C.; JAGOE, C. H. (Eds.). **Ecotoxicology: a hierarchical treatment**, United States of America: Lewis Publishers, p.1-9, 1996.

ODUM, E. P. **Fundamentos de Ecologia**. 4ªed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 977p., 1988.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P. The Comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. **Nature Protocols**, v.1, p. 23-29, 2006.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. **Radiation Research**, v. 122, p. 86-94, 1990.

OLIVEIRA, R.; DOMINGUES, I.; GRISOLIA, C. K.; SOARES, A. M. V. M. Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 16, p. 679-88, 2009.

ORSI, M. L. **Biologia populacional de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) da bacia do rio Paranapanema (baixo do rio Tibagi)**. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

ORSI, M. L.; CARVALHO, E. D.; FORESTI, F. Biologia populacional de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae) do médio rio Paranapanema, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, p. 207-218, 2004.

ORSI, M. L.; SHIBATTA, O. A.; SILVA-SOUZA, A. T. Caracterização biológica de populações de peixes do rio Tibagi, localidade de Sertãoópolis, p. 425-432, 2002. In: MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J. A. (Eds.). **A bacia do rio Tibagi**. Londrina, UEL, 595p.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K. L. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.123, p. 291-298, 1984.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A.; TELES, M.; OLIVEIRA, M.; REBELO, J. E.; POMBO, L. Biotransformation and genotoxic biomarkers in mullet species (*liza* sp.) from a contaminated coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal). **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 107, p. 133-153, 2005.

PANDRANGI, R.; PETRAS, M.; RALPH, S.; VRZOC, M. Alkaline Single Cell Gel (Comet) Assay and genotoxicity monitoring using Bullheads and Carp. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 26, p. 345-356, 1995.

PARSONS, P. A. Fluctuating asymmetry: a biological monitor of environmental and genomic stress. **Heredity**, v. 68, p. 361-364, 1992.

PAWLOWSKY, U. **Tratabilidade de Efluentes de Fabricação de Herbicidas**. 318 p. Tese (Doutorado) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1994.

POFF, N. L.; BRINSON, M. M.; DAY, J. W., Jr. Aquatic ecosystems & Global climate change: Potential Impacts on Inland Freshwater and Coastal Wetland Ecosystems in the United States. **Pew Center on Global Climate Change**. 56 p. 2002. Disponível em: <<http://www.pewclimate.org/docUploads/aquatic.pdf>> Acesso em: 10 de setembro de 2010.

POLARD, T.; JEAN, S.; MERLINA, G.; LAPLANCHE, C.; PINELLI, E.; GAUTHIER, L. Giemsa versus acridine orange staining in the fish micronucleus assay and validation for use in water quality monitoring, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 74, p. 144-149, 2011.

PORTO, J. I. R.; ARAUJO, C. S. O.; FELDBERG, E. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. **Environmental Research**, v. 97, p. 287-292, 2005.

POSTEL, S. L. Aquatic ecosystem: protection and drinking water utilities. **American Water Works Association**, v. 99, p. 52-63, 2007.

POWERS, D. A Fish as model systems. **Science**, v. 246, p. 352- 358, 1989.

PRIOLI, S. M. A. P. **Relações genéticas e filogenéticas entre espécies do gênero *Astyanax* do rio Iguaçu, analisados por marcadores de DNA mitocondrial e RAPD**. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2001.

QUAGLIA, L. J. C.; QUADROS, R. A. Q. Caracterização da toxicidade aguda dos efluentes setoriais e final da Bahia Sul Celulose. In: **Anais Congresso anual de celulose de papel da ABTCP**. São Paulo, p. 577-589, 1995.

RAMSDORF, W. A., FERRARO, M. V. M., OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A., COSTA, J. R. M., CESTARI, M. M. Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v, 158, p. 77-85, 2009.

RAMSDORF, W. **UTILIZAÇÃO DE DUAS ESPÉCIES DE *Astyanax* (*Astyanax sp B* e *A. altiparanae*) COMO BIOINDICADORES DE REGIÃO CONTAMINADA POR AGROTÓXICO (FAZENDA CANGÜIRI – UFPR)**. 127 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D. M. F., MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, p. 173-200, 2003.

RIXIAN, L. et al. The genotoxic effects of benzo[a]pyrene and methamidophos on black porgy evaluated by comet assay. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 23, p. 455-460, 2005.

RUSSO, C.; ROCCO, L.; MORESCALCHI, M. A.; STINGO, V. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, p. 168–174, 2004.

SANCHEZ-GALAN, S.; LINDE, A.R.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Brown trout and European minnow as target species for genotoxicity tests: Differential sensitivity to heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 43, p. 301-304, 1999.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SHARMA, S. et al. Studies on the genotoxicity of Endosulfan in different tissues of fresh water fish *Mystus vittatus* using the comet assay. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, p. 617-623, 2007.

SHUGART, L. Biological monitoring: testing for genotoxicity, In: J.F. McCarthy, L.R. Shugart (Eds.), **Biomarkers of Environmental Contamination**. Lewis Publishers, Chelsea, p. 217-227, 1990.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experience Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SINGH, N. P.; DANNER, D. B.; TICE, R. R.; MCCOY, M. T.; COLLINS, G. D.; SCHNEIDER, E. L. Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm. **Experimental Cell Research**, v. 184, p. 461-470, 1989.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The Comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. **Methods in Molecular Biology**, v. 291, p. 85-95, 2005.

SPERLING, E. V. Considerações sobre a saúde de ambientes aquáticos. **Bio**, v. 2, p. 53-56, 1993.

STRUNJAK-PEROVIC, I.; COZ-RAKOVAC, R.; POPOVIC, N. T.; JADAN, M. Seasonality of nuclear abnormalities in gilthead sea bream *Sparus aurata* (L.) erythrocytes. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 287-291, 2009.

SULLIVAN, C.; MITCHELMORE, C. L.; R. C. HALE, VAN VELD, P. A. Induction of CYP1A and DNA damage in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) following exposure to biosolids. **Science of the Total Environment**, v. 384, p. 221-228, 2007.

SUZUKI, F. M.; ORSI, M. L. Formação de cardumes por *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characidae) no rio Congonhas, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, p. 566-569, 2008.

THEODORAKIS, C. W.; L. R. SHUGART. Genetic ecotoxicology III: The relationship between DNA strand breaks and genotype in mosquitofish exposed to radiation. **Ecotoxicology**, v. 7, p. 227-236, 1998.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

UEADA, T., HAYASHI, M., KOIDE, N., SOFUNI, T., KOBAYASHI, J. A preliminary study of the micronucleus test by acridine orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells. **Water Science and Technology**, v. 25, p. 235-240, 1992.

USEPA: ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY OF UNITED STATES. **Guidelines for Ecological Risk Assessment**. EPA/630/R-95/002F, Federal Register 63(93):26846-26924, Washington, DC, 1998.

VAN der OOST, R. BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

VANZELLA, T. P.; MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. **Mutation Research**, v. 631, p. 36-43, 2007.

VETHAK, A. D.; ap RHEINALLT, T. Fish disease as a monitor for marine pollution: the case of the North Sea. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 2, p. 1-32, 1992.

VIARENGO, A. et al. A Biomonitoring study assessing the residual biological effects of pollution caused by the HAVEN Wreck on marine organisms in the Ligurian Sea (Italy). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, p. 607-616, 2007.

WEITZMAN, H. S.; MALABARBA, L. R. Perspectives about the phylogen and classification of the Characidae (Teleostei: Characiformes). In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S. (Eds.). **Phylogeny and classification of neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998.

WHITEHEAD, K.M. et al. Genotoxicity in native fish associated with agricultural runoff events. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, p. 2868-2877, 2004.

WILLIAMS, R. C.; METCALFE, C. D. Development of an *in vivo* hepatic micronucleus assay with rainbow trout. **Aquatic Toxicology**, v. 23, p. 193-202, 1992.

WINTER, M. J.; DAY, N.; HAYES, R.A.; TAYLOR, E.W.; BUTLER, P.J.; CHIPMAN, J.K. DNA strand breaks and adducts determined in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) exposed to rivers exhibiting variable water quality around Birmingham, UK, **Mutation Research**, v. 552, p. 163-175, 2004.

WINTERINGHAM, F. P. W. Comparative ecotoxicology of halogenated hydrocarbon residues. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 1, p. 407-425, 1977.

WIRZINGER, G.; WELTJE, L.; GERCKEN, J.; SORDYL, J. Genotoxic damage in field-collected three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.): A suitable biomonitoring tool?. *Mutation Research*, v. 628, p. 19–30, 2007.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E.; GOLDSTEIN, E. G. Toxicidade de efluentes industriais da bacia do rio Piracicaba. **Revista Ambiente**, v. 2, p. 39-42, 1988.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E.; GOLDSTEIN, E. G.; SOUZA, H. B. DE. Avaliação de toxicidade em sistema de tratamento biológico de afluentes líquidos. **Revista SABESP**, n. 166, p. 1-6, 1992.

ZEGURA, B.; HEATH, E.; CERNOSA, A.; FILIPIC, M. Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. **Chemosphere**, v. 75, p. 1453-1460, 2009.

ZHANG, Y.; WANG, Y.; YU, R.; ZHANG, S.; WU, Z. Effects of heavy metals Cd^{2+} , Pb^{2+} and Zn^{2+} on DNA damage of loach *Misgurnus anguillicaudatus*. **Frontiers of Biology in China**, v. 3, p. 50-54, 2008.

4 ARTIGO

Manuscrito a ser enviado para a publicação na revista Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

GALVAN, G. L.; VICARI, T.; YAMAMOTO, C. I.; CESTARI, M. M. Genotoxicity assessment of chemical effluents pre and post-treatment using as a bioindicator the fish *Astyanax altiparanae* (Characidae). **Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 2011.

Avaliação genotóxica de efluentes químicos de laboratórios de instituição de ensino e pesquisa utilizando como bioindicador o peixe *Astyanax altiparanae* (Characidae)

Gabrieli Limberger Galvan^{a, *}, Taynah Vicari^a, Carlos Itsuo Yamamoto^b, Marta Margarete Cestari^a

^a Departamento de Genética, Laboratório de Mutagênese Ambiental, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, Caixa Postal: 19071, CEP 81531-990, Curitiba, PR – Brasil

^b Departamento de Engenharia Química, Laboratório de Análise de Combustíveis Automotivos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, Caixa Postal: 19024, CEP 81531-990, Curitiba, PR – Brasil

* Autor correspondente. Tel.: +55 41 33611727; fax: +55 41 33611793

Endereço de e-mail: gabrielibiologia@gmail.com (G.L. Galvan),
taynah_vicari@hotmail.com (T. Vicari), citsuo@gmail.com (C.I. Yamamoto),
margaces@ufpr.br (M.M. Cestari)

RESUMO

A degradação da qualidade da água pelo despejo de efluentes vem colocando em risco a saúde dos organismos, inclusive das populações humanas, sendo um problema ambiental de escala global. Os efluentes provenientes dos laboratórios das instituições de ensino e pesquisa, mesmo sendo compostos por misturas complexas, são raramente avaliados e fiscalizados por órgãos ambientais. Desta forma, o presente estudo objetiva avaliar os efeitos genotóxicos em indivíduos de *Astyanax altiparanae* expostos aos efluentes químicos pré e pós-tratamento, provenientes de laboratórios do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Paraná, através da técnica do ensaio cometa e teste do micronúcleo (MN) e alterações morfológicas nucleares (AMN). Os peixes foram expostos às concentrações de 10%, 50% e 100% do efluente bruto (EB) e do efluente tratado (ET) pelo período de 96 horas, foram utilizados 60 peixes por concentração do contaminante, sendo amostrados 15 indivíduos a cada 24 horas. O ensaio cometa foi avaliado em eritrócitos e células branquiais. As freqüências de micronúcleo (MN), alterações morfológicas nucleares (AMN) e eritrócitos imaturos (EI) foram analisadas em eritrócitos. Os resultados obtidos através do ensaio cometa indicam que em todas as concentrações e períodos de exposição, ambos os efluentes induziram danos no material genético dos tipos celulares avaliados. Tanto nos eritrócitos quanto nas células branquiais houve redução do efeito genotóxico no tempo de 48 horas na concentração de 10%. De maneira geral, o ET apresentou maior potencial genotóxico do que o EB nas concentrações de 50% e 100%. Foram obtidas baixas freqüências de MN e AMN, sendo observado decréscimos nas freqüências de MN em todos os grupos contaminados no tempo de 72 horas e nas freqüências de AMN nos grupos contaminados com os efluente tratado nos tempos de 24 e 48 horas e decréscimo na freqüência de EI em todos os tratamentos. Ambos os efluentes induziram danos no material genético e apresentaram caráter citotóxico, evidenciando que os efluentes avaliados causam risco ao ecossistema.

Palavras-chave: águas residuais, ensaio cometa, teste do micronúcleo, peixe.

4.1 Introdução

As águas superficiais vêm recebendo grandes quantidades de resíduos provenientes de atividades industriais, agrícolas, de fontes domésticas, hospitalares e estações de tratamento. Esses resíduos apresentam características físico-químicas e microbiológicas amplamente variadas que alteram a qualidade da água e degradam o ambiente receptor, colocando em risco a saúde humana e a biota associada. A contaminação dos corpos hídricos é um problema ambiental de escala global, sendo agravado pelo aumento populacional, pela crescente carga e complexidade de substâncias químicas lançadas diretamente na água, através da lixiviação de resíduos agrícolas e deposição das emissões atmosféricas. No entanto, esse aumento da degradação dos corpos hídricos é acompanhado pela crescente demanda de água de qualidade para consumo humano.

A simples detecção de contaminantes em compartimentos abióticos e bióticos não é suficiente a menos que seus efeitos biológicos ou ecológicos sejam devidamente avaliados. Os contaminantes ocorrem muitas vezes no ambiente como misturas complexas, sendo o risco real de tal exposição diferente do determinado através da avaliação de uma substância específica [1]. Desta forma, torna-se necessário a utilização de ensaios ecotoxicológicos associados às análises físico-químicas para mensurar de forma holística o efeito das misturas complexas no ambiente, especialmente pelos efeitos sinérgicos, aditivos e antagônicos que podem ocorrer.

Muitos xenobióticos presentes nas águas superficiais, não só põem em risco a sobrevivência e fisiologia dos organismos [2-6], como também induzem alterações genéticas [7-9] que podem levar à mutações [10] e/ou carcinogênese [11]. Substâncias genotóxicas causam danos no DNA e induzem mutações, podendo afetar a biodiversidade e aumentar o risco para desenvolvimento de câncer em humanos [12]. A literatura sobre resíduos industriais e efluentes é extensa [13]. Ohe et al. [14] revisaram 128 artigos publicados na literatura científica desde 1990 sobre mutagenicidade e genotoxicidade de águas superficiais e demonstraram que as avaliações podem ser divididas em duas grandes categorias: testes com bactérias, que inclui o teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (correspondendo a 37%), SOS Chromotest e *Salmonella umu-test* (6%); outros ensaios

bacteriológicos (6%) e ensaios com organismos aquáticos e plantas *in vivo* e *in vitro*, como o teste do micronúcleo píceo (17%), ^{32}P -post-labelling (13%), ensaio cometa (10%) e ensaio alcalino de desespiralização (7%), danos cromossômicos (3%) e outros representam (1%).

Apesar do potencial genotóxico dos efluentes lançados no ambiente aquático, de acordo com Houk [13], apenas 2,5% dos estudos utilizam animais *in vivo* para avaliação do risco genotóxico dessas misturas complexas, sendo bem restritos os que examinam os efeitos genotóxicos da exposição direta de peixes a efluentes sob condições laboratoriais.

A utilização de peixes como organismos sentinelas no monitoramento do ambiente aquático apresenta diversas vantagens: representam o maior grupo entre os vertebrados [15]; com respostas de alta relevância ecológica à exposição a agentes tóxicos [16]; frequentemente de forma semelhante a outros vertebrados, inclusive humanos [17]; acumulam substâncias tóxicas; respondem a baixas concentrações de mutágenos; desempenham importante papel na rede trófica [18]; podem ser utilizados *in vivo*, em bioensaios e biomonitoramento e ainda representam uma importante fonte de proteína para as populações humanas.

O potencial genotóxico da exposição de peixes a águas residuais de diversas origens tem sido avaliado através do ensaio cometa e frequência de micronúcleo e alterações morfológicas nucleares, sendo considerados sensíveis biomarcadores, como demonstrado em bioensaios [19], mas principalmente através de biomonitoramento de corpos hídricos sob forte influência urbano/industrial [8, 20-22] e avaliação de sistemas e substâncias utilizadas no tratamento de efluentes [23-25].

Entre os geradores de efluentes químicos estão os laboratórios das instituições de ensino e pesquisa, cuja vazão é baixa quando comparada a outras fontes geradoras de resíduos, como efluentes municipais, no entanto, são compostos por uma grande variedade de substâncias, cujos efeitos tóxicos são desconhecidos. No Brasil, a maioria das Universidades não tem programas sistemáticos de minimização, gerenciamento e tratamento de seus resíduos, incluindo os laboratórios químicos. Não há legislação específica e fiscalização por órgãos ambientais.

Desta forma, o presente estudo objetiva avaliar os efeitos genotóxicos dos efluentes químicos *in natura* e tratado, provenientes dos laboratórios das Usinas

Piloto do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR), utilizando a espécie *Astyanax altiparanae* (Characidae) como bioindicador em condições agudas de exposição.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Estação de tratamento de efluentes

Os efluentes analisados são provenientes dos laboratórios de ensino, pesquisa e prestação de serviços à comunidade, instalados nas Usinas Piloto do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Paraná. Em função dos diferentes objetivos, características e nível de atividade, a composição e o volume dos resíduos gerados é amplamente variável. Os efluentes são compostos principalmente por detergentes, ácidos e bases diluídas, resíduos de meio de cultura, resíduos de petróleo e hidrocarbonetos derivados.

Os efluentes são exclusivamente derivados da disposição nas pias dos laboratórios, sendo a vazão média gerada, em torno de $45 \text{ m}^3 \cdot \text{mês}^{-1}$. Os efluentes são submetidos a um tratamento primário para a remoção de óleos desemulsificados em uma caixa separadora óleo/água. Os óleos e graxas removidos são diretamente enviados para co-processamento por uma empresa especializada. O efluente bruto segue para o tanque de equalização (TE-300) com tempo de retenção média de dois dias, onde é homogeneizado e aerado por ar difuso para promover a equalização do efluente e volatilização dos solventes.

No tanque de sedimentação, são adicionados agentes de neutralização (óxido de cálcio CaO), coagulação (sulfato de alumínio $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) e floculação (polímero aniônico). As doses são definidas pelo ensaio “Jar-Test”.

Após a sedimentação, o sobrenadante (efluente tratado) é despejado diretamente no sistema municipal de esgoto e o lodo formado é desidratado em filtro prensa (FP-700) e enviado para co-processamento.

4.2.2 Coleta e preservação das amostras

Os efluentes foram coletados diretamente do sistema de tratamento, amostras foram enviadas para as análises físico-químicas [26-48]. 260 litros foram coletados e acondicionados em frascos de polietileno com revestimento para evitar a entrada de luz. O volume necessário para o teste de toxicidade aguda foi imediatamente transportado ao laboratório de Citogenética Animal e o volume excedente mantido à temperatura de -4°C até o momento de uso. O pH das amostras foi ajustado para 7,0 com hidróxido de sódio (NaOH).

4.2.3 Condições experimentais

Os espécimes de *Astyanax altiparanae* ($4,4\pm0,4$ cm e $0,8\pm0,3$ g) popularmente conhecidos como lambaris, foram obtidos do comércio local e transportados em sacos plásticos com água e oxigênio até o laboratório, onde foram aclimatados em tanques de 250 litros durante três semanas.

Após este período, os peixes utilizados no teste de toxicidade aguda foram aclimatados durante uma semana em água reconstituída (água destilada; cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e cloreto de potássio (KCl)) [49]. A água utilizada nos ensaios de genotoxicidade foi previamente filtrada (filtros de 5 micras, 1 micrômetro e carvão ativado) e declorificada por aeração.

Durante o período de aclimação a água foi mantida à temperatura ambiente ($21,05\pm0,64$ °C), pH $7,0\pm0,25$ e sob aeração constante. O laboratório foi mantido com fotoperíodo de 12 horas claro: 12 horas escuro, a alimentação dos peixes foi realizada diariamente com ração comercial, sendo interrompida 24 horas antes da contaminação.

4.2.4 Teste de toxicidade aguda

O teste foi conduzido para obtenção da concentração letal mediana (CL_{50}) dos efluentes químicos e determinação das concentrações a serem utilizadas nos

ensaios de genotoxicidade. O procedimento foi realizado de acordo com a metodologia descrita pela ABNT [50], com modificações [49].

Os peixes foram expostos às concentrações de 20; 25; 33; 50 e 100%, tanto no efluente bruto (EB) quanto no efluente tratado (ET). Para avaliar a sensibilidade dos organismos, foi realizada a contaminação com a substância de referência, dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) nas concentrações de 5; 10; 25; 50 e 100 mg L⁻¹.

Para o teste de toxicidade aguda foram utilizados 6 peixes por grupo em replicata, a densidade de estocagem não excedeu 1g L⁻¹. O teste foi conduzido em sistema de fluxo estático por 96 horas, e as soluções-teste preparadas em água reconstituída, incluindo o grupo controle.

4.2.5 Bioensaio de genotoxicidade

As amostras do efluente bruto (EB) e tratado (ET) foram diluídas com água filtrada e decolorificada para a preparação das soluções-teste nas concentrações de 10% 50% e 100%, correspondendo a EB₁₀; EB₅₀; EB₁₀₀; ET₁₀; ET₅₀ e ET₁₀₀.

Para cada solução foram utilizados 60 peixes (densidade < 1g L⁻¹) por 96 horas em sistema de fluxo semi-estático. Foram amostrados 15 peixes por grupo a cada 24 horas, inclusive nos grupos controle.

4.2.6 Ensaio cometa

Os peixes foram anestesiados com benzocaína (0,15 g L⁻¹) [51], as amostras de sangue foram retiradas por punção intracardíaca com micro-hematócritos heparinizados e as brânquias removidas com o auxílio de pinças, todos os arcos branquiais de ambos os lados foram coletados.

O ensaio cometa foi realizado de acordo com Speit e Hartmann [52], com modificações [53]. Os danos no DNA foram avaliados utilizando microscópio Leica de epifluorescência sob magnificação de 400x. Para cada peixe, 100 nucleóides foram visualmente analisados [54].

4.2.7 Teste do micronúcleo (MN) e alterações morfológicas nucleares (AMN)

O teste do micronúcleo písceo (MN) e de alterações morfológicas nucleares (AMN) com coloração fluorescente de laranja de acridina (LA) foram realizados de acordo com a técnica descrita por Ueda et al. [55], no entanto, foi utilizada a mesma diluição de sangue e soro bovino fetal preparada para o ensaio cometa. Para cada peixe, foram analisadas 1000 células, sob microscopia de epifluorescência com magnificação de 1000x, sendo avaliada a presença de MN e AMN em eritrócitos imaturos (policromáticos) e maduros (normocromáticos). As AMN foram classificadas de acordo com Carrasco et al. [56].

4.2.8 Frequência de eritrócitos imaturos (%EI)

Os eritrócitos imaturos foram identificados segundo Çavas e Ergene-Gözükara [57] e analisados nas mesmas lâminas de MN e AMN. O cálculo para a obtenção da frequência de eritrócitos imaturos (%EI) foi realizada de acordo com Pacheco e Santos [58], foram analisadas 1000 células por peixe.

4.2.9 Análise estatística

A concentração letal mediana (CL_{50}) foi calculada através do método Trimmed Spearman-Kärber [59]. Para comparação do efeito letal entre os diferentes grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

Nos demais testes (ensaio cometa, MN, AMN e %EI) a comparação entre os diferentes tempos (24, 48, 72 e 96 horas) e concentrações (EB_{10} ; EB_{50} ; EB_{100} ; ET_{10} ; ET_{50} e ET_{100}) entre si e o grupo controle foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis.

Para a comparação entre os efluentes bruto e tratado da mesma concentração e tempo de exposição foi utilizado o teste de Mann Whitney. O valor de ($p < 0,05$) foi considerado significativo em todas as análises.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Caracterização físico-química dos efluentes

As características dos efluentes bruto e tratado, seguidos pelos valores limite admissíveis pelos padrões brasileiros estão apresentadas na Tab.5. Não foram detectados resíduos de pesticidas organoclorados e organofosforados nas amostras. As concentrações de metais obtidas em ambos efluentes foram baixas, estando de acordo com a legislação brasileira.

O EB apresentou concentrações de sólidos sedimentáveis acima do permitido pela legislação, com adequação dos níveis após o tratamento. Houve aumento de fenol após o tratamento, superando o limite permitido. Em ambos os efluentes, a concentração de sulfeto e óleos e graxas está em desacordo com a legislação. Após o tratamento houve redução nas concentrações de ferro, magnésio, potássio, zinco, DBO_5 , DQO, surfactantes, sólidos sedimentáveis, pH, alcalinidade total e fluoreto, sendo observado aumento de oxigênio dissolvido, sólidos totais, óleos e graxas, fenol, dureza total e sulfeto.

Tabela 5. Caracterização físico-química dos efluentes.

| Parâmetros analisados | Efluente bruto | Efluente tratado | Emissões permitidas | Referências | Metodologia de análise |
|-------------------------------------------------------------|----------------|------------------|---------------------|-------------|------------------------|
| Organoclorados (mg.L ⁻¹) | N.D. | N.D. | - | - | 27 |
| Organonitrogenados (mg.L ⁻¹) | N.D. | N.D. | - | - | 28 |
| Alumínio (mg.L ⁻¹) | <1 | <1 | 3,0 | 60 | 29 |
| Arsênio (mg.L ⁻¹) | <0,005 | <0,005 | 0,1 | 61 | - |
| Cádmio (mg.L ⁻¹) | < 0,02 | < 0,02 | 0,2 | 61 | 30 |
| Chumbo (mg.L ⁻¹) | <0,1 | <0,1 | 0,5 | 61 | 30 |
| Cobalto (mg.L ⁻¹) | <0,05 | <0,05 | 1,0 | 60 | 30 |
| Cobre (mg.L ⁻¹) | <0,05 | <0,05 | 1,0 | 61 | 30 |
| Cromo (mg.L ⁻¹) | <0,05 | <0,05 | 0,5 | 61 | 30 |
| Antimônio (mg.L ⁻¹) | <0,3 | <0,3 | 0,005 | 61 | 30 |
| Bário (mg.L ⁻¹) | <0,25 | <0,25 | 5,0 | 61 | 29 |
| Lítio (mg.L ⁻¹) | <0,01 | <0,01 | 10,0 | 62 | 30 |
| Molibdênio (mg.L ⁻¹) | <0,1 | <0,1 | 0,5 | 62 | - |
| Estanho (mg.L ⁻¹) | <1,5 | <1,5 | 4,0 | 61 | 29 |
| Ferro (mg.L ⁻¹) | 6,3 | 1,7 | 15,0 | 61 | 30 |
| Magnésio (mg.L ⁻¹) | 4,4 | 0,7 | - | - | 30 |
| Manganês (mg.L ⁻¹) | 0,6 | 0,6 | 1,0 | 61 | 30 |
| Potássio (mg.L ⁻¹) | 3,5 | 3,3 | - | - | 30 |
| Prata (mg.L ⁻¹) | < 0,1 | < 0,1 | 0,1 | 61 | 30 |
| Sódio (mg.L ⁻¹) | 18,8 | 18,4 | - | - | 30 |
| Zinco (mg.L ⁻¹) | 0,13 | < 0,02 | 5,0 | 61 | 30 |
| Níquel (mg.L ⁻¹) | < 0,05 | < 0,05 | 2,0 | 61 | 30 |
| Vanádio (mg.L ⁻¹) | < 1 | < 1 | 1,0 | 62 | 29 |
| Selênio (mg.L ⁻¹) | < 0,005 | < 0,005 | 0,3 | 61 | 31 |
| Mercurio (mg.L ⁻¹) | < 0,001 | < 0,001 | 0,01 | 61 | 32 |
| Demanda bioquímica de oxigênio (mg.L ⁻¹) | 41,7 | 11,7 | 50 | 63 | 33 |
| Demanda química de oxigênio (mg.L ⁻¹) | 92,2 | 52,1 | 125 | 63 | 34 |
| Surfactantes (mg.L ⁻¹) | 1,1 | 0,8 | 2,0 | 62 | 35 |
| Sólidos sedimentáveis (ml.L ⁻¹) | 3,0* | 0,1 | 1,0 | 61 | 36 |
| Sólidos totais (mg.L ⁻¹) | 230,5 | 281,0 | - | - | 37 |
| pH | 6,9 | 6,3 | 5,0 - 9,0 | 61 | 38 |
| Óleos e graxas (ml.L ⁻¹) | 24,4* | 26,0* | 20,0 | 61 | 39 |
| Fenol (mg.L ⁻¹) | 0,03 | 0,25* | 0,10 | 62 | - |
| Benzeno (mg.L ⁻¹) | < 2 | < 2 | 0,02 | 61 | - |
| Tolueno (µg.L ⁻¹) | < 4 | < 4 | 2,0 | 61 | - |
| Etilbenzeno (µg.L ⁻¹) | < 2 | < 2 | 90,0 | 61 | - |
| Xileno (µg.L ⁻¹) | < 2 | < 2 | 300,0 | 61 | - |
| Hidrocarbonetos poliaromáticos totais (µg.L ⁻¹) | < 200 | < 200 | - | - | - |
| Alcalinidade total (mg.L ⁻¹) | 61,7 | 37,1 | - | - | 40 |
| Dureza (mg.L ⁻¹) | 49,4 | 64,9 | ≤ 200,0 | 62 | 41 |
| Fósforo total (mg.L ⁻¹) | < 0,05 | < 0,05 | 1,0 | 60 | 42 |
| Nitrato (mg.L ⁻¹) | < 0,05 | < 0,05 | 10,0 | 61 | 43 |
| Nitrito (mg.L ⁻¹) | < 0,01 | < 0,01 | 1,0 | 61 | 44 |
| Nitrogênio amoniacal (mg.L ⁻¹) | < 1 | < 1 | 20,0 | 61 | 45 |
| Oxigênio dissolvido (mg.L ⁻¹) | 3,5 | 7,9 | ≥ 5,0 | 61 | 46 |
| Sulfito (mg.L ⁻¹) | < 1 | < 1 | 1,0 | 60 | 47 |
| Sulfeto (mg.L ⁻¹) | 1,4* | 1,6* | 1,0 | 61 | 48 |
| Fluoride (mg.L ⁻¹) | 0,4 | < 1 | 10,0 | 60 | 49 |

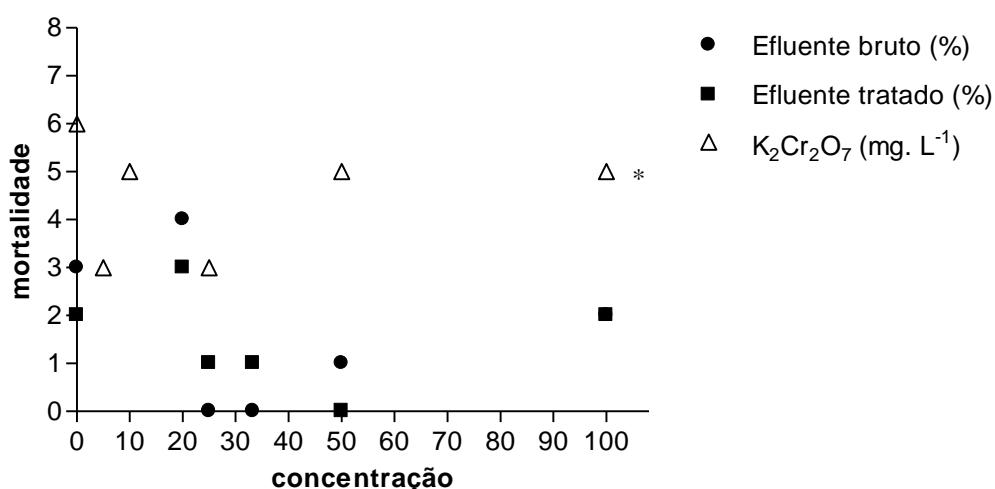
Propriedades físico-químicas dos efluentes coletados dos laboratórios do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Paraná, seguido pelos valores limites de emissão admissíveis pela legislação brasileira. N.D.: não detectado; Asteriscos indicam valores em desacordo com a legislação.

4.3.2 Teste de toxicidade aguda

Durante o experimento a temperatura da água foi de $21,5 \pm 0,6$ °C e o pH $7,7 \pm 0,1$. A dureza obtida no grupo controle foi de $357,2 \pm 33,8$ nas soluções-teste foram mensurados os valores na menor (20%) e maior concentração (100%), sendo $303,5 \pm 31,0$ e $55,2 \pm 6,0$ respectivamente.

Houve maior mortalidade no controle do que nos grupos contaminados. Não foi observado gradiente de mortalidade em relação à dose e o tempo de exposição, não sendo possível calcular a CL_{50} . A mortalidade de peixes expostos aos efluentes bruto e tratado não diferiu estatisticamente, demonstrando similaridade de resposta ao gradiente de concentração (Fig. 2).

Figura 2. Teste de toxicidade em *Astyanax altiparanae* após exposição aguda aos efluentes químicos e à substância de referência.



Mortalidade de peixes após 96 horas de exposição aos efluentes químicos e à substância de referência dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$). Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0.05$).

Testes de toxicidade tradicionalmente fornecem informações como diretrizes regulatórias para os poluentes em ecossistemas aquáticos naturais com base em testes de letalidade aguda, como CL_{50} [64], geralmente aplicados em organismos de referência internacional, como *Danio rerio* e *Pimephales promelas*, poucos estudos são conduzidos utilizando peixes neotropicais e espécies comuns nos ecossistemas brasileiros [65].

Astyanax é um gênero dominante na América do Sul [66] com ampla distribuição na região Neotropical, sendo abundante nas bacias hidrográficas brasileiras [67]. *Astyanax altiparanae* apresentam ampla distribuição, relevância ecológica e econômica e atende aos critérios de seleção de organismos-teste para ensaios toxicológicos, no entanto, não respondeu satisfatoriamente aos testes de toxicidade aguda (letalidade).

Diferentes táxons de peixes apresentam respostas fisiológicas particulares de tolerância às condições de estresse. Isto implica que para um estressor específico, a severidade, tempo e mecanismo de ação pode variar dependendo da espécie a qual foi aplicada [68, 69]. De acordo com o revisado por Schreck [69], a resposta ao estresse também é uma variável polimórfica, no entanto, as manifestações inter e intra-específica em reação ao estresse, não têm sido contrastadas.

A alta mortalidade no grupo controle pode estar associada à alteração comportamental numa condição de estresse, como o confinamento. Interações agonísticas foram observadas após a redução da área, quando os peixes foram transferidos para os aquários de teste, mesmo estando mantidos na mesma densidade de estocagem que no período de aclimação. No grupo controle, a alta mortalidade foi causada por agressões, indicando competição intra-específica.

Nos grupos contaminados, a mortalidade foi menor do que no grupo controle, observaram-se alterações comportamentais, como drástico decréscimo na atividade locomotora e nos eventos agonísticos, sugerindo a ocorrência de alocação de energia para outros propósitos, como sobrevivência, mediante a exposição ao agente químico estressor, visto que, o comportamento territorialista é energeticamente custoso [70]. De acordo com Schreck et al. [68], a realocação de energia é uma resposta ao estresse observada em peixes, assim como em outros vertebrados.

Johnsson et al. [71] observaram redução de agressões territoriais e outras interações em alevinos recém-eclodidos de *Oncorhynchus mykiss* expostos a efluentes da indústria de celulose. Redução da performance natatória, aumento na concentração média de hemoglobina e glicose no sangue foram observadas em trutas expostas a efluentes de papel e celulose na concentração de 70% [72].

Cascata de eventos fisiológicos ocorre quando o organismo tenta resistir à morte ou para restabelecer a homeostasia mediante uma perturbação [68]. Existem

inúmeras respostas terciárias que afetam o comportamento normal do indivíduo [73], interferindo no sucesso de migração, forrageamento, fuga, e ainda em escala populacional em termos de capacidade reprodutiva [74].

O estudo do comportamento tem sido considerado uma ferramenta promissora em ecotoxicologia, para avaliação de efeitos subletais de poluentes aquáticos nas populações de peixes [75-78]. O comportamento é uma ligação entre fisiologia e processos ecológicos [64].

Na literatura, os efeitos fisiológicos de xenobióticos incluem disfunção sensorial; hormonal; neurológica e metabólica, com implicações no comportamento de peixes. A exposição a contaminantes pode levar ao desenvolvimento de síndromes comportamentais, como: hipoatividade; hiperatividade e síndrome de deformidade física [75].

O comportamento natatório de peixes é prejudicado pela exposição a uma diversidade de contaminantes [79]. A demanda energética adicional mediante ao estresse químico, pode contribuir para a redução do desempenho natatório, e conseqüentemente afetar o comportamento social, reprodutivo, a habilidade de capturar presas e evitar predadores [80].

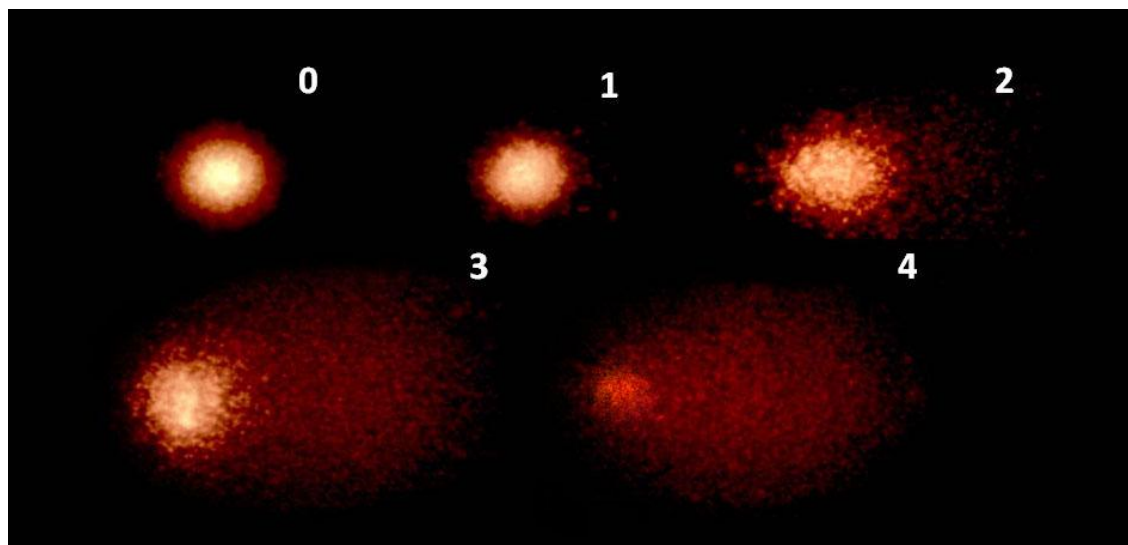
4.3.3 Ensaio cometa

Durante o experimento não houve mortalidade de peixes, a temperatura da água foi de $21,4 \pm 0,4$ °C e o pH $7,3 \pm 0,3$.

Através da análise do ensaio cometa em eritrócitos (Fig. 3) pode ser observado que após 24 horas de exposição todas as concentrações causaram aumento de danos no DNA em relação ao grupo controle ($p < 0.05$), o efluente bruto (EB) e tratado (ET) não diferiram entre si (Fig. 4). No tempo de 48 horas, a concentração de 10% não induziu aumento de danos no DNA, já as concentrações de 50 e 100% foram genotóxicas, com exceção do grupo EB₁₀₀.

Nos períodos de 72 e 96 horas, todas as concentrações induziram quebras no DNA ($p < 0.05$). Foi observado que o efluente tratado causou mais danos ao DNA em relação ao efluente bruto na concentração de 100% nos tempos de 48, 72 e 96 horas.

Figura 3. Ensaio cometa em eritrócitos de *Astyanax altiparanae*.



Classificação visual das classes de dano de acordo com o tamanho e intensidade da cauda do cometa: (0) sem dano; (1) pouco dano; (2) dano moderado; (3) dano elevado; (4) dano máximo. Aumento de 400x em microscopia de epifluorescência.

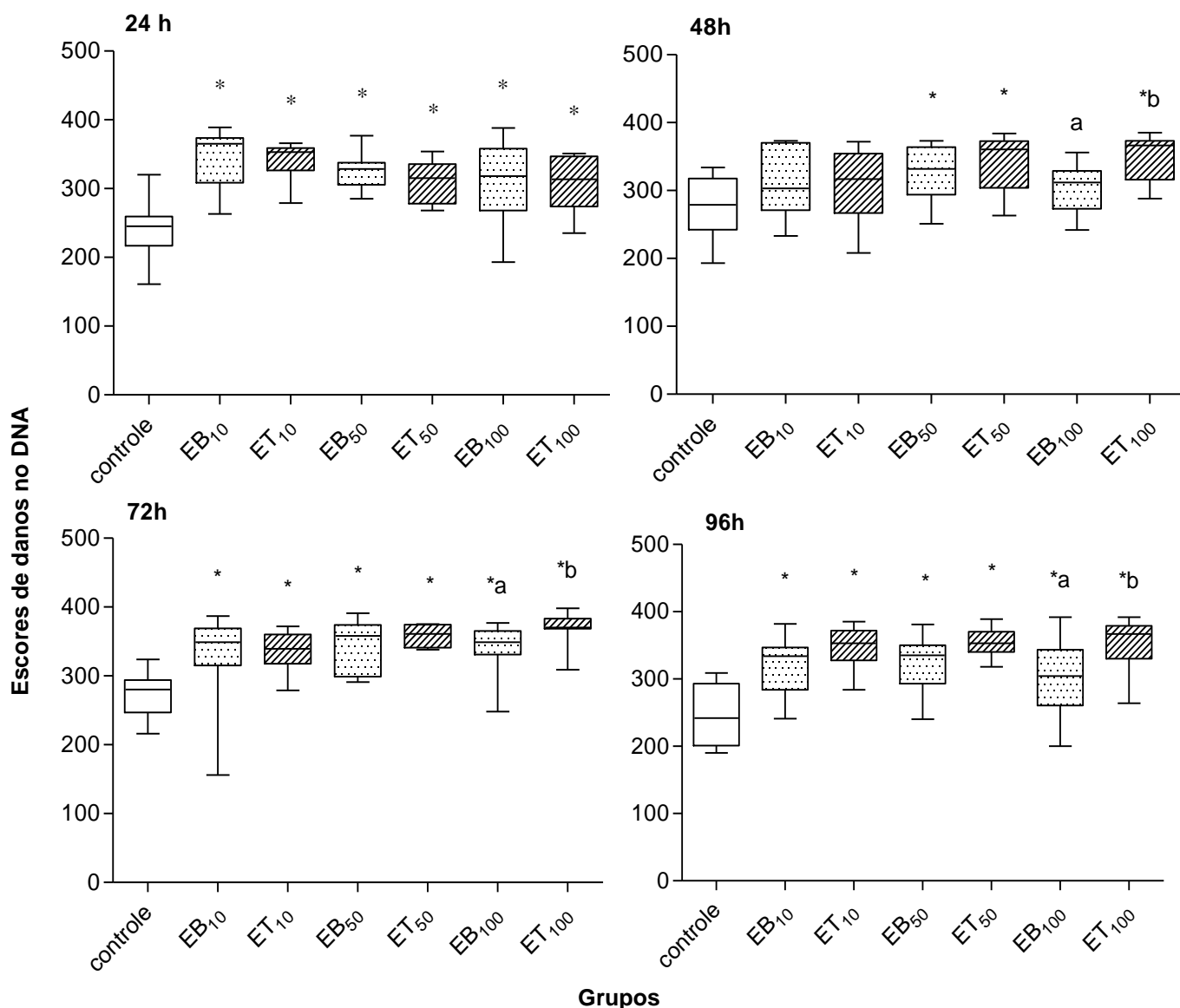
Em relação à análise das brânquias, nos tempos de 24, 72 e 96 horas, todas as concentrações foram genotóxicas, com diferença significativa em relação ao grupo controle (Fig. 5). Nos tempos de 48 e 72 horas, em todo o gradiente de concentração, pode ser observado que os escores de danos no efluente tratado foram maiores do que no efluente bruto ($p < 0.05$).

A contaminação dos peixes com o EB₁₀ e o ET₁₀ causou aumento de danos no material genético tanto em eritrócitos quanto em células branquiais no tempo de 24 horas, com redução da genotoxicidade em 48 horas e subsequente aumento nos tempos de 72 e 96 horas de exposição.

O decréscimo de danos no DNA observado no tempo de 48 h pode estar relacionado ao mecanismo de reparo do DNA, esse efeito foi observado apenas na menor concentração, sugerindo que a capacidade de reparo é dependente do nível de dano do DNA.

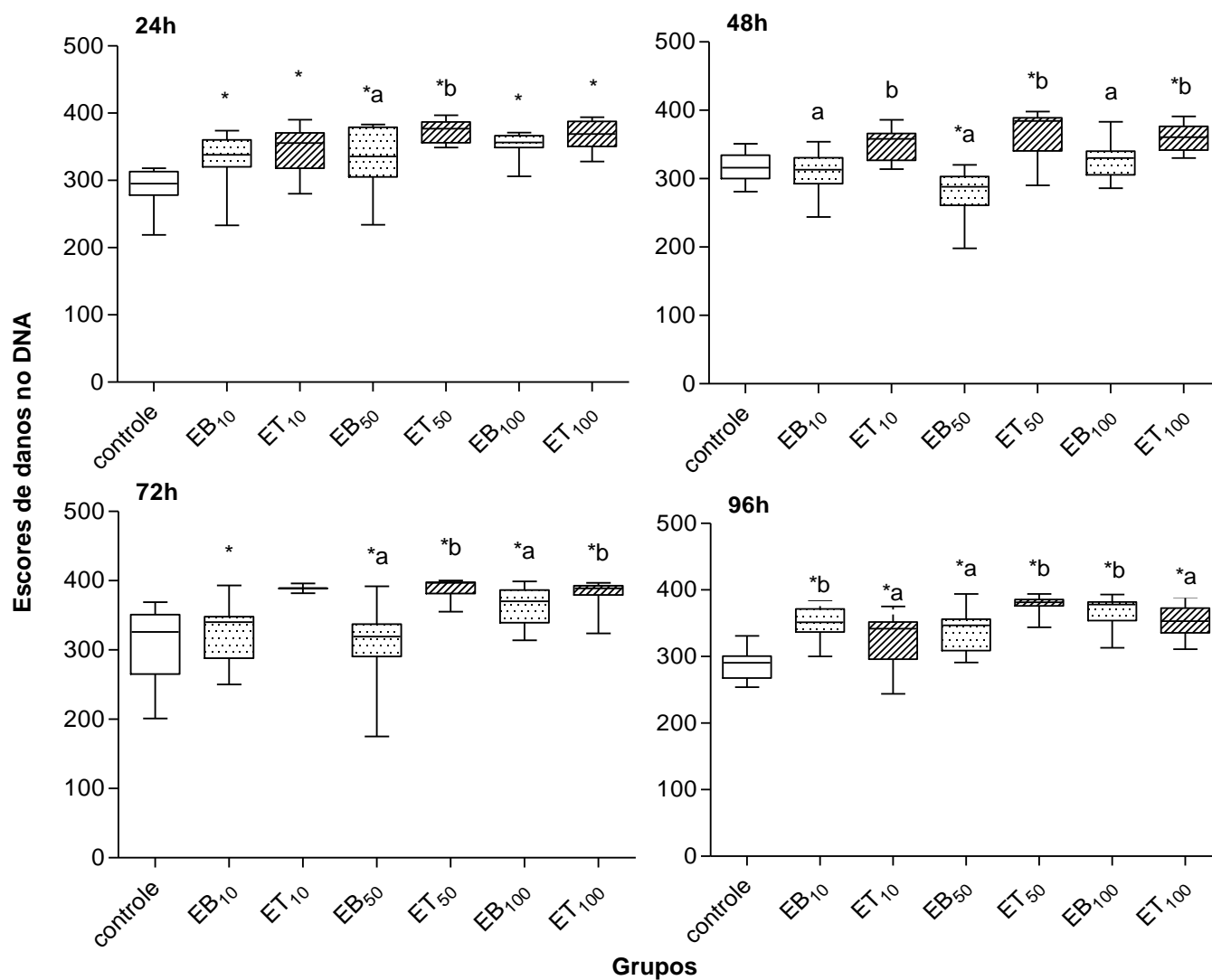
Resultados similares foram observados por Rixian et al. [81] que avaliaram o efeito do benzo[a]pireno e metamidofos e mistura dos compostos em *Acanthopagrus schlegelii* utilizando o ensaio cometa. Os autores sugerem a ocorrência de dois mecanismos: processos de reparo do DNA e interação com a enzima metabolizadora citocromo P450.

Figura 4. Danos no DNA em eritrócitos de *Astyanax altiparanae* após exposição aguda aos efluentes químicos.



Danos no DNA em eritrócitos do sangue periférico de *A. altiparanae* expostos por 96 horas em diferentes concentrações de efluentes químicos pré e pós-tratamento. Valores em escores de danos representados pelos valores máximo, mínimo, mediana e quartis. Asteriscos indicam diferença estatística dos grupos contaminados em relação ao grupo controle; letras expressam diferença entre o efluente bruto (EB) e tratado (ET) na mesma concentração ($p < 0.05$).

Figura 5. Danos no DNA em células branquiais de *Astyanax altiparanae* após exposição aguda aos efluentes químicos.



Danos no DNA em células branquiais de *A. altiparanae* expostos por 96 horas em diferentes concentrações de efluentes químicos pré e pós-tratamento. Valores em escores de danos representados pelos valores máximo, mínimo, mediana e quartis. Asteriscos indicam diferença estatística dos grupos contaminados em relação ao grupo controle; letras expressam diferença entre o efluente bruto (EB) e tratado (ET) na mesma concentração ($p < 0.05$).

Resultados similares foram observados por Rixian et al. [81] que avaliaram o efeito do benzo[a]pireno e metamidofos e mistura dos compostos em *Acanthopagrus schlegeli* utilizando o ensaio cometa. Os autores sugerem a ocorrência de dois mecanismos: processos de reparo do DNA e interação com a enzima metabolizadora citocromo P450.

Existem poucos estudos sobre reparo do DNA em peixes, no entanto, é um importante mecanismo de resistência a carcinógenos [82]. Em peixes, são conhecidos dois mecanismos: Reparo por excisão de bases, quando ocorre alterações no DNA devido à hidrólise, ataque de espécies reativas ao oxigênio, alquilação, e outros produtos do metabolismo celular normal que podem levar a produção de danos oxidativos de bases; alquilação de bases de centros nucleofílicos e indução de sítios abásicos; o outro mecanismo de reparo conhecido em peixes é o Reparo por excisão de nucleotídeos, onde ocorre distorção da hélice de DNA causada por mutágenos ambientais e exposição a luz UV. No entanto, o tempo de reparo pode variar de acordo com a espécie e o tipo de tecido [83].

O ensaio cometa tem sido proposto com uma sensível, rápida, econômica e versátil ferramenta para a detecção de agentes genotóxicos em peixes [21, 84-86], gerando informações estágios iniciais de exposição, que podem ser utilizados para evitar ou diminuir os efeitos deletérios em espécies sentinelas, assim como em humanos [87].

Através do ensaio cometa e teste do micronúcleo (MN) Deguchi et al. [88] avaliaram o efeito do chorume bruto e tratado nas concentrações de 10 e 100% em *Carassius auratus*. Foram observadas altas frequência de MN em células branquiais e danos elevados no DNA no lixiviado bruto. Os autores propuseram um índice interessante que combina os resultados da CL50, MN e ensaio cometa, para monitorar a qualidade da água.

Danos elevados no DNA e aumento nos valores de diversos antioxidantes hepáticos e biomarcadores de estresse oxidativo foram obtidos após a exposição de *Oreochromis niloticus* a efluentes de lagoa anaeróbica e final do sistema de tratamento de resíduos de suinocultura [89].

Em outro estudo, espécimes de *Pimephales promelas* foram expostos a lodo de esgoto tratado, observou-se indução de danos genéticos nos hepatócitos e nos níveis de CYP1A hepático, com significativa correlação entre os biomarcadores [90],

os autores sugerem que os danos no DNA foram produtos da indução do CYP1A via hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) presentes no lodo de esgoto.

O potencial genotóxico dos resíduos bruto e tratado provenientes de água processada gerada durante a extração de gás e petróleo foi verificado em *Gambusia affinis* através do ensaio cometa e MN em eritrócitos [91].

As propriedades tóxicas e genotóxicas de efluentes da indústria de papel e celulose foram avaliadas através da análise da fração solúvel do sedimento, efluente tratado e amostras da água do rio receptor, sendo detectados danos genéticos mensurados em *Anguilla Anguilla*, através do ensaio cometa em eritrócitos e hepatócitos e análise de alterações morfológicas nucleares (AMN) em eritrócitos [19].

O ensaio cometa em peixes tem sido utilizado para avaliar a qualidade dos ambientes aquáticos de diversas regiões do planeta impactadas pelo despejo de efluentes. O potencial genotóxico do Rio Sarno (Itália), região afetada por múltiplas fontes poluidoras de origem industrial, doméstica e agrícola foi verificado através da indução de danos no DNA de eritrócitos da espécie *Gambusia holbrooki* avaliados pelo ensaio cometa e teste do micronúcleo [92]. No Brasil, o Lago Extremoz, sob forte influencia urbano/industrial foi avaliado, sendo o potencial genotóxico associado à presença de metais pesados [85]. Lemos et al. [8] reportaram danos no DNA em *Tilapia rendalli* coletados no Lago Igapó II (Brasil) que recebe despejos de efluentes domésticos e industriais.

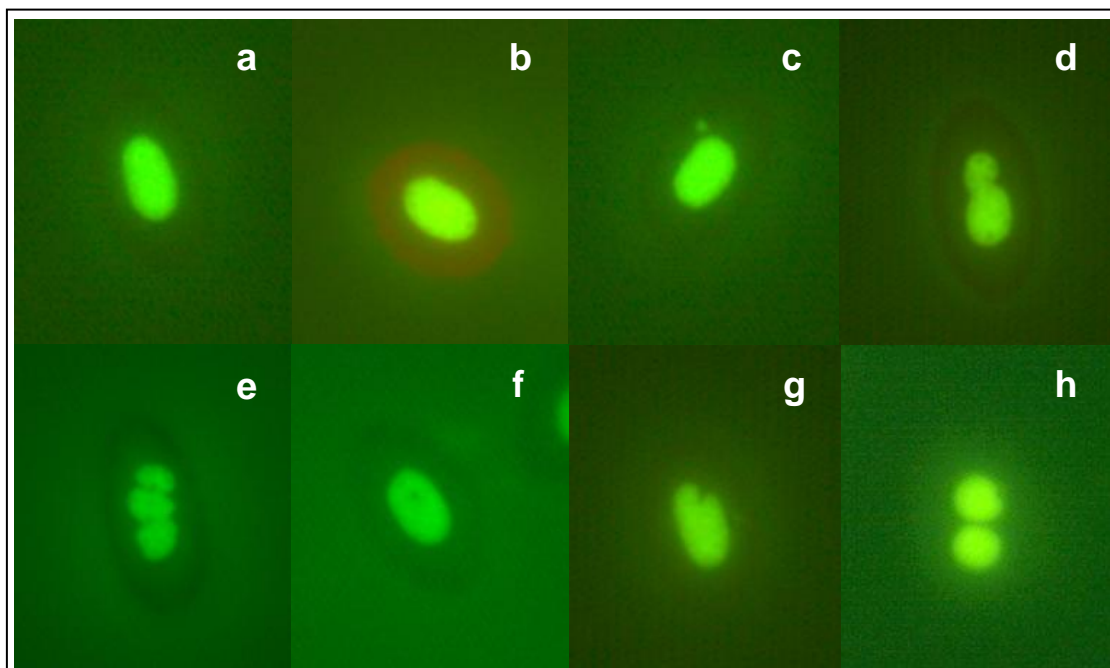
Foi verificado aumento de quebras no DNA de *Limanda limanda* coletados no Canal Oriental Inglês (França), contaminados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e policlorobifenóis (PCBs) [20]. No norte da Alemanha, a qualidade da água de três riachos que recebem efluentes de origem industrial, urbana e resíduos de escoamento agrícola, foram avaliados através do ensaio cometa em *Gasterosteus aculeatus* apresentando potencial genotóxico [93].

4.3.4 Teste do micronúcleo (MN) e alterações morfológicas nucleares (AMN)

As frequências de MN e AMN em eritrócitos de *Astyanax altiparanae* (Fig. 6) foram baixas em todos os grupos. Pode ser observada redução nas frequências de

MN nos grupos contaminados em relação ao controle no tempo de 72 horas e no ET_{50} no tempo de 96 horas ($p < 0,05$) (Tab. 6).

Figura 6. Micronúcleos (MN) e alterações morfológicas nucleares (AMN) em eritrócitos periféricos poli e normocromáticos de *Astyanax altiparanae*.



Eritrócitos periféricos, em a) célula madura (normocromática) normal; b) célula imatura (policromática) normal; c) célula micronucleada; d) núcleo blebbed; e) núcleo lobed; f) núcleo vacuolated; g) núcleo notched; h) binucleated. Células coradas com laranja de acridina e visualizadas em microscópio de epifluorescência com aumento de 1000x.

Decréscimos significativos nas freqüências de AMN foram obtidos nos grupos ET_{50} no tempo de 24 horas e ET_{10} , ET_{50} e ET_{100} no tempo de 48 horas. De maneira geral, a freqüência total das anomalias foi menor no efluente tratado diferindo do efluente bruto ($p < 0,05$).

Uma diminuição gradual na freqüência de MN com um aumento da duração e concentração dos agentes genotóxicos foi encontrada por Das e Nanda [94], e explicado por um efeito inibitório sobre a divisão celular e subsequente impedimento na passagem das células afetadas para a circulação periférica [95]. Este efeito pode ser resultado tanto da inibição da síntese do DNA [96] quanto da inibição direta da eritropoiese [97] causada por vários agentes genotóxicos, em certas concentrações, e considerado como uma propriedade citotóxica dos xenobióticos [98].

Tabela 6. Frequência média de eritrócitos imaturos (%EI), alterações morfológicas nucleares (%AMN) e micronúcleos (%MN) no sangue periférico de *Astyanax altiparanae* após exposição aguda aos efluentes bruto e tratado.

| Tempo de exposição | Tratamento | %oEI (M ± EP) | %oAMN (EM+EI) (M ± EP) | | | | | | | |
|--------------------|-------------------|------------------|------------------------|-------------|-------------|--------------------------|-------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | | | BL | LB | VC | NT | BN | Sub-total | MN | Total |
| 24 horas | Controle | 54,56 ± 9,19 | 0,36 ± 0,23 | 0,00 ± 0,00 | 0,14 ± 0,10 | 2,28 ± 0,73 | 0,07 ± 0,07 | 2,85 ± 0,88 | 0,21 ± 0,11 | 3,07 ± 0,92 |
| | EB ₁₀ | 5,21 ± 8,13 * | 0,36 ±0,17 | 0,21 ± 0,15 | 0,00 ± 0,00 | 4,64 ± 1,05 ^b | 0,07 ± 0,07 | 5,29 ± 1,06 ^b | 0,36 ± 0,13 ^b | 5,64 ± 1,11 ^b |
| | EB ₅₀ | 0,13 ± 0,13 * | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 1,88 ± 0,81 ^b | 0,00 ± 0,00 | 1,88 ± 0,81 ^b | 0,00 ± 0,00 | 1,88 ±0,81 ^b |
| | EB ₁₀₀ | 0,00 ± 0,00 * | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,17 ± 0,17 | 0,00 ± 0,00 | 0,17 ± 0,17 | 0,00 ± 0,00 | 0,17 ± 0,17 |
| | ET ₁₀ | 0,00 ± 0,00 * | 0,14 ± 0,10 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,29 ± 0,19 ^a | 0,00 ± 0,00 | 0,43 ± 0,20 ^a | 0,00 ± 0,00 ^a | 0,43 ± 0,20 ^a |
| | ET ₅₀ | 0,13 ± 0,09 * | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,13 ± 0,09 ^a | 0,00 ± 0,00 | 0,13 ± 0,09 ^{a*} | 0,00 ± 0,00 | 0,13 ± 0,09 ^{a*} |
| | ET ₁₀₀ | 0,25 ± 0,18 * | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,25 ± 0,13 | 0,00 ± 0,00 | 0,25 ± 0,13 | 0,00 ± 0,00 | 0,25 ± 0,13 |
| 48 horas | Controle | 31,77 ± 6,27 | 0,36 ± 0,15 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 1,82 ± 0,46 | 0,09 ± 0,09 | 2,08 ± 0,42 | 0,00 ± 0,00 | 2,08 ± 0,42 |
| | EB ₁₀ | 0,50 ± 0,42 * | 0,10 ± 0,10 | 0,09 ± 0,09 | 0,00 ± 0,00 | 1,27 ± 0,36 ^b | 0,09 ± 0,09 | 1,55 ± 0,43 ^b | 0,09 ± 0,09 | 1,64 ± 0,45 ^b |
| | EB ₅₀ | 0,19 ± 0,19 * | 0,19 ± 0,10 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 1,13 ± 0,26 ^b | 0,00 ± 0,00 | 1,31 ± 0,29 ^b | 0,13 ± 0,09 | 1,44 ± 0,29 ^b |
| | EB ₁₀₀ | 0,07 ± 0,07 * | 0,08 ± 0,08 | 0,08 ± 0,08 | 0,00 ± 0,00 | 1,75 ± 0,52 ^b | 0,08 ± 0,08 | 2,00 ± 0,55 ^b | 0,00 ± 0,00 | 2,00 ± 0,55 ^b |
| | ET ₁₀ | 0,00 ± 0,00 * | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,33 ± 0,14 ^a | 0,00 ± 0,00 | 0,33 ± 0,14 ^{a*} | 0,08 ± 0,08 | 0,42 ± 0,19 ^{a*} |
| | ET ₅₀ | 0,00 ± 0,00 * | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00± 0,00 | 0,11 ± 0,11 ^a | 0,00 ± 0,00 | 0,11 ± 0,11 ^{a*} | 0,00 ± 0,00 | 0,11 ± 0,11 ^a |
| | ET ₁₀₀ | 0,00 ± 0,00 * | 0,07 ± 0,07 | 0,07 ± 0,07 | 0,00 ± 0,00 | 0,53 ± 0,34 ^a | 0,00 ± 0,00 | 0,67 ± 0,40 ^{a*} | 0,00 ± 0,00 | 0,67 ± 0,40 ^a |
| 72 horas | Controle | 33,50 ± 6,31 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 1,33 ± 0,42 | 0,00 ± 0,00 | 1,33 ± 0,42 | 0,33 ± 0,21 | 1,43 ± 0,53 |
| | EB ₁₀ | 0,67 ± 0,67 * | 0,53 ± 0,19 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 2,27 ± 0,65 ^b | 0,00 ± 0,00 | 2,80 ± 0,98 ^b | 0,07 ± 0,07 * | 2,87 ± 0,98 ^b |
| | EB ₅₀ | 0,20 ± 0,11 * | 0,27 ± 0,21 | 0,47 ± 0,40 | 0,00 ± 0,00 | 1,67 ± 0,65 | 0,00 ± 0,00 | 2,40 ± 1,04 | 0,00 ± 0,00 * | 2,40 ± 1,04 |
| | EB ₁₀₀ | 0,00 ± 0,00 * | 0,29 ± 0,29 | 0,00 ± 0,00 | 0,07 ± 0,07 | 1,86 ± 0,19 | 0,00 ± 0,00 | 2,21 ± 0,86 | 0,00 ± 0,00 * | 2,21 ± 0,86 |
| | ET ₁₀ | 0,00 ± 0,00 * | 0,08 ± 0,08 | 0,00 ± 0,00 | 0,17 ± 0,17 | 0,42 ± 0,24 ^a | 0,00 ± 0,00 | 0,67 ± 0,28 ^a | 0,00 ± 0,00 * | 0,67 ± 0,28 ^a |
| | ET ₅₀ | 0,54 ± 0,37 * | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,92 ± 0,25 | 0,00 ± 0,00 | 0,92 ± 0,24 | 0,00 ± 0,00 * | 0,92 ± 0,24 |
| | ET ₁₀₀ | 0,00 ± 0,00 * | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,64 ± 0,27 | 0,00 ± 0,00 | 0,64 ± 0,25 | 0,00 ± 0,00 * | 0,64 ± 0,25 |
| 96 horas | Controle | 16,33 ± 4,75 | 0,20 ± 0,11 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,87 ± 0,27 | 0,00 ± 0,00 | 1,07 ± 0,27 | 0,00 ± 0,00 | 1,07 ± 0,27 |
| | EB ₁₀ | 0,21 ± 0,16 | 0,07 ± 0,07 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,86 ± 0,35 | 0,00 ± 0,00 | 0,93 ± 0,39 | 0,07 ± 0,07 | 1,00 ± 0,39 |
| | EB ₅₀ | 0,00 ± 0,00 * | 0,20 ± 0,11 | 0,00 ± 0,00 | 0,27 ± 0,18 | 1,47 ± 0,44 | 0,00 ± 0,00 | 1,93 ± 0,59 | 0,07 ± 0,07 | 2,00 ± 0,59 |
| | EB ₁₀₀ | 0,21 ± 0,16 | 0,14 ± 0,10 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 1,00 ± 0,30 ^b | 0,00 ± 0,00 | 1,14 ± 0,28 ^b | 0,00 ± 0,00 | 1,14 ± 0,28 ^b |
| | ET ₁₀ | 0,36 ± 0,36 * | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,14 ± 0,14 | 0,29 ± 0,13 | 0,00 ± 0,00 | 0,43 ± 0,17 | 0,00 ± 0,00 | 0,43 ± 0,17 |
| | ET ₅₀ | 0,00 ± 0,00 * | 0,00 ± 0,00 | 0,09 ± 0,09 | 0,00 ± 0,00 | 0,55 ± 0,31 | 0,00 ± 0,00 | 0,64 ± 0,31 | 0,27 ± 0,14 * | 0,91 ± 0,37 |
| | ET ₁₀₀ | 0,00 ± 0,00 * | 0,00 ± 0,00 | 0,07 ± 0,07 | 0,00 ± 0,00 | 0,29 ± 0,16 ^a | 0,00 ± 0,00 | 0,36 ± 0,20 ^a | 0,00 ± 0,00 | 0,36 ± 0,20 ^a |

Valores expressos em média e erro padrão. Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa dos grupos contaminados em relação ao grupo controle; letras expressam diferença entre o efluente bruto (EB) e tratado (ET) na mesma concentração ($p < 0.05$).

De modo geral, as frequências de MN obtidas, inclusive no grupo controle, foram baixas se comparadas com outros estudos realizados sob condições semelhantes (em bioensaio, utilizando peixes sob exposição aguda, via hídrica, com análise de MN corados com LA) [57 e 99]. No entanto, nestes trabalhos, houve indução de MN após exposição aos agentes xenobióticos.

A utilização da laranja de acridina (LA) na análise de MN é o método mais sensível e realístico, visto que, a coloração convencional com giemsa pode levar a resultados falso positivos através da contagem de artefatos, o que não é possível com LA que é um corante seletivo de ácidos nucleicos [99] e ainda possibilita a visualização de MN nas espécies que possuem cromossomos pequenos [98].

A frequência de MN em eritrócitos periféricos de peixes é geralmente baixa e pode ocorrer espontaneamente [96 e 98] a taxas que variam de acordo com a manipulação dos peixes e técnica empregada [17]. Apesar da ampla utilização de eritrócitos na avaliação de genotoxicidade, alguns autores consideram ser menos sensível do que outros tecidos, como brânquias [100-103].

Em todos os grupos, o núcleo notched (NT) foi mais frequente, principalmente no efluente bruto EB que diferiu do ET ($p < 0.05$). As AMN são consideradas indicadores de genotoxicidade e complementam a análise de MN [102], no entanto, os mecanismos de formação dessas alterações ainda não são compreendidos.

A genotoxicidade de efluentes de diversas origens tem sido atestada através da indução na frequência de MN e AMN em células de peixes. Em condições de bioensaio foram avaliados efluentes da indústria de papel e celulose [19], indústria têxtil [103], resíduos de refinaria de petróleo e processamento de cromo [18], efluentes industriais e urbanos [104], e *in situ*, foram avaliadas regiões fortemente impactadas por resíduos agrícolas, urbanos [105] e industriais [106-107].

A utilização da laranja de acridina (LA) na análise de MN é o método mais sensível e realístico, visto que, a coloração convencional com giemsa pode levar a resultados falso positivos através da contagem de artefatos, o que não é possível com LA que é um corante seletivo de ácidos nucleicos [99] e ainda possibilita a visualização de MN nas espécies que possuem cromossomos pequenos [98].

A frequência de MN em eritrócitos periféricos de peixes é geralmente baixa e pode ocorrer espontaneamente [96 e 98] a taxas que variam de acordo com a

manipulação dos peixes e técnica empregada [17]. Apesar da ampla utilização de eritrócitos na avaliação de genotoxicidade, alguns autores consideram ser menos sensível do que outros tecidos, como brânquias [100-103].

Em todos os grupos, o núcleo notched (NT) foi mais freqüente, principalmente no efluente bruto EB que diferiu do ET ($p < 0.05$). As AMN são consideradas indicadores de genotoxicidade e complementam a análise de MN [102], no entanto, os mecanismos de formação dessas alterações ainda não são compreendidos.

A genotoxicidade de efluentes de diversas origens tem sido atestada através da indução na freqüência de MN e AMN em células de peixes. Em condições de bioensaio foram avaliados efluentes da indústria de papel e celulose [19], indústria têxtil [103], resíduos de refinaria de petróleo e processamento de cromo [18], efluentes industriais e urbanos [104], e *in situ*, foram avaliadas regiões fortemente impactadas por resíduos agrícolas, urbanos [105] e industriais [106-107].

4.3.5 Freqüência de eritrócitos imaturos (%EI)

As contaminações com os efluentes químicos causaram redução na freqüência de eritrócitos periféricos imaturos de *A. altiparanae*. Foram encontradas diferenças significativas em todos os grupos contaminados em relação ao controle (Tab. 6). Os grupos EB e ET quando comparados entre si, no mesmo período de exposição e concentração, não diferiram ($p > 0,05$). Os resultados evidenciam que os efluentes químicos tanto o bruto quanto o tratado causaram inibição da eritropoiese por ação citotóxica. Decréscimos na proporção de eritrócitos imaturos em relação a eritrócitos maduros são considerados indicadores de citotoxicidade [57,58 e 108].

A diminuição de anomalias nucleares (MN e AMN) e da freqüência de eritrócitos imaturos pode ser consequência da remoção de eritrócitos maduros com lesões nucleares via baço e provável inibição da eritropoiese. De acordo com Pacheco e Santos [58] o aumento de remoção de eritrócitos maduros deve levar a um aumento na freqüência de eritrócitos imaturos, no entanto, os autores obtiveram alterações das respostas genotóxicas em *Anguilla anguilla* através da redução da

freqüência de AMN após exposição rápida a altas doses de contaminantes e exposição longa em baixas concentrações, acompanhado por redução na freqüência de EI, sugerindo que os compostos citotóxicos matam os eritrócitos em vez de formar uma lesão nuclear não letal, comprometendo a expressão de anormalidades nucleares através da ação citotóxica.

Os resultados indicam que os agentes xenobióticos podem ter conduzido à morte celular dos eritrócitos imaturos que já estavam na circulação periférica, visto que houve grande redução de EI após 24 horas de contaminação, tempo insuficiente para a maturação celular. Existem poucos dados na literatura sobre a cinética eritrocitária de teleósteos, de acordo com Murad [109] a maturação eritrocítica em *Carassius auratus* ocorre entre 16 e 21 dias. Em peixes, a hematopoiese sofre influencia de diversos fatores biológicos e ambientais [110].

Os dados sobre o tempo de vida dos eritrócitos circulantes é variada, sendo de 105 dias em *Oncorhynchus mykiss* (Salmonidae) e 310 em *Cyprinus carpio* (Ciprinidae) [111], em triplóides de *Carassius auratus langsdorfii* (Ciprinidae) 102 dias [112], em *Tinca vulgaris* (Ciprinidae) 150 dias [113], já em *Carassius auratus* (Ciprinidae) é de 160 dias [114].

A análise da freqüência de eritrócitos imaturos em peixes foi avaliada por Çavas e Ergene-Gözükara [57] que reportaram decréscimos na proporção de eritrócitos imaturos acompanhado por aumento na freqüência de MN nessas células em *Oreochromis niloticus* após tratamento com metronidazol. Pacheco e Santos [58] obtiveram resultados semelhantes após exposição de *Anguilla anguilla* a benzo(a)pireno, ácido deidroabietico e efluente da indústria de clareamento de celulose.

4.4 Conclusões

A genotoxicidade dos efluentes bruto e tratado provenientes dos laboratórios do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Paraná foi avaliada através do ensaio cometa em eritrócitos e células branquiais, freqüência de alterações morfológicas nucleares e micronúcleo em eritrócitos. O potencial citotóxico foi analisado pela freqüência de eritrócitos imaturos.

Através da análise do ensaio cometa foi verificado que ambos os efluentes causaram danos no DNA de *Astyanax altiparane* em todas as concentrações e períodos de exposição avaliados, com exceção do tempo de 48 horas na menor concentração, indicando que as águas residuais dos laboratórios analisados são genotóxicas e que o sistema de tratamento é ineficiente na remoção de substâncias tóxicas ou os químicos adicionados no tratamento dos resíduos são genotóxicos e/ou podem apresentar um efeito sinérgico.

Foi observada redução nas frequências de MN, AMN e EI nos grupos contaminados, esses resultados podem estar relacionados a um efeito supressor citotóxico.

Sugere-se que estudos sejam realizados para avaliar o potencial genotóxico das substâncias utilizadas no tratamento de efluentes, em função dos riscos à saúde associados à exposição a estes químicos.

As substâncias adicionadas durante o processo de clarificação dos efluentes frequentemente melhoram a qualidade da água quando avaliada através das análises físico-químicas, no entanto, efeitos tóxicos subletais podem ser mascarados.

Sugere-se que sejam desenvolvidos sistemas de gerenciamento para minimizar o impacto ambiental causados pela produção e disposição dos resíduos dos laboratórios das instituições de ensino e pesquisa.

Para uma avaliação mais realística de risco ecológico, é recomendada a inserção do ensaio cometa na legislação brasileira como uma ferramenta de avaliação ecotoxicológica em programas de monitoramento ambiental.

É reconhecida a necessidade da utilização de espécies nativas em testes de toxicidade aguda, no entanto, nas condições avaliadas, a espécie *A. altiparanae* não atendeu ao propósito, desta forma, sugerem-se alterações das condições experimentais, como a utilização de aquários maiores ou aumento de replicatas com menor número de peixes, a fim de evitar reações agonísticas que alterem os resultados. Para a avaliação de genotoxicidade a espécie pode ser considerada um sensível bioindicador.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES pela bolsa de mestrado e ao Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA) pela realização das análises físico-química dos efluentes.

Referências

- [1] A.N. Jha, Ecotoxicological applications and significance of the comet assay, *Mutagenesis* 23 (2008) 207-221.
- [2] J.P. Giesy, R.A. Hoke, Freshwater sediment toxicity bioassessment: rationale for species selection and test design, *J. Great Lakes Res.* 15 (1989) 539-569.
- [3] R.D. Handy, Intermittent exposure to aquatic pollutants: assessment, toxicity and sublethal responses in fish and invertebrates, *Comp Biochem. Physiol.* 107 (1994) 171-184.
- [4] L. Cardoso, S.J.de Luca, Toxidez de efluentes municipais biologicamente tratados e desinfetados com hipoclorito e ferrato de sódio, *Eng. Sanit. Amb.* 9 (2004) 26-29.
- [5] V.V. Arkhipchuk, V.V. Goncharuk, Complex assessment of toxicity, cyto-, and genotoxicity of polyhexamethyl guanidine concurrently with the use of plant and animal test-organisms and their cells. *J. Water Chem. Technol.* 29 (2007) 197–202.
- [6] A. Katsumiti, F.X. Valdez Domingos, M. Azevedo, M.D. da Silva, R.C. Damian, M.I.M. Almeida, H.C. Silva de Assis, M.M. Cestari, M.A.F. Randi, C.A. Oliveira Ribeiro, C.A. Freire, An assessment of acute biomarker responses in the demersal catfish *Cathorops spixii* after the Vicuña Oil Spill in a harbour estuarine area in Southern Brazil, *Environ. Monit. Assess.* 152 (2009) 209-222.
- [7] D.L. Fabacher, J.M. Besser, C.J. Schmitt, J.C. Harahbargar, P.H. Peterman, J.A. Lebo, Contaminated sediments from tributaries of the Great Lakes: chemical characterization and carcinogenic effects in Medaka (*Oryzias latipes*), *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20 (1991) 17-34.
- [8] N.G. Lemos, A.L. Dias, A.T. Silva-Souza, M.S. Mantovani, Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19 (2005) 197–201.
- [9] G. Frenzilli, V. Scarcelli, I. Del Barga, M. Nigro, L. Förlin, C. Bolognesi, J. Sturve, DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Göteborg harbor, *Mutat. Res.* 552 (2004) 187–195.
- [10] S. De Flora, M. Bagnasco, P. Zanicchi, Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazard in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea, *Mutat. Res.* 258 (1991) 285-320.
- [11] L.C. Folmar, G.R. Gardner, J. Hickey, S. Bonomelli, T. Moody, Serum chemistry and histopathological evaluations of brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*) from Buffalo and Niagara Rivers, New York, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 25 (1993) 298-303.
- [12] B. Zegura, E. Heath, A. Cernosa, M. Filipic, Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples, *Chemosphere* 75 (2009) 1453–1460.
- [13] V.S. Houk, The genotoxicity of industrial wastes and effluents: a review, *Mutat. Res.* 277 (1992) 91-138.
- [14] T. Ohea, T. Watanabe, K. Wakabayashi, Mutagens in surface waters: a review, *Mutat. Res.: Rev. Mutat. Res.* 567 (2004) 109–149.
- [15] D. Powers, A Fish as model systems, *Science* 246 (1989) 352- 358.
- [16] R. Van der Oost, J. Beyer, N.P.E. Vermeulen, Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13 (2003) 57-149.

- [17] K.Al-Sabti, C.D. Metcalfe, Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water, *Mutat. Res.: Genet. Toxicol.* 343 (1995) 121-135.
- [18] T.Çavas, S. Ergene-Gözükara, Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents, *Aquat. Toxicol.* 74 (2005) 264-271.
- [19] V.L. Maria, A.C. Correia, M.A. Santos, Genotoxic and hepatic biotransformation responses induced by the overflow of pulp mill and secondary-treated effluents on *Anguilla anguilla* L., *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55 (2003) 126-137.
- [20] F. Akcha, F.V. Hubert, A. Pfohl-Leszkowicz, Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds, *Mutat. Res.: Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 534 (2003) 21-32.
- [21] M.J. Winter, N. Day, R.A. Hayes, E.W. Taylor, P.J. Butler, J.K. Chipman, DNA strand breaks and adducts determined in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) exposed to rivers exhibiting variable water quality around Birmingham, UK, *Mutat. Res.: Fundam. Mol. Mech. Mutag.* 552 (2004) 163-175.
- [22] J.S. Barbosa, T.M. Cabral, D.N. Ferreira, L.F. Agnez-Lima, S.R.B. de Medeiros, Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73 (2010) 320-325.
- [23] P.L. Lima, J.C. Benassi, R.C. Pedrosa, J. Dal Magro, T.B. Oliveira, D. Wilhelm Filho, Time-Course Variations of DNA Damage and Biomarkers of Oxidative Stress in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Exposed to Effluents from a Swine Industry, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50 (2006) 23-30.
- [24] B. Gustavino, A. Buschini, M. Monfrinotti, M. Rizzoni, L. Tancioni, P. Poli, C. Rossi, Modulating effects of humic acids on genotoxicity induced by water disinfectants in *Cyprinus carpio*, *Mutat. Res.: Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 587 (2005) 103-113.
- [25] A. Buschini, A. Martino, B. Gustavino, M. Monfrinotti, P. Poli, C. Rossi, M. Santoro, A.J.M. Dörr, M. Rizzoni, Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization, *Mutat. Res.: Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 557 (2004) 119-129.
- [26] Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 6630B – Liquid-liquid extraction gas chromatographic method, 21st ed, 2005.
- [27] U.S. EPA Method 507, Determination of nitrogen and phosphorus containing pesticides in water by gas chromatography with a nitrogen – phosphorus detector, review 2.1, 1995.
- [28] Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st ed., 2005. Chapter 3000, p. 3-20 – 3-22 (Method 3111 D).
- [29] Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st ed., 2005. Chapter 3000, p. 3-17 – 3-19 (Method 3111 B).
- [30] Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st ed., 2005. Chapter 3000 p. 3-32- 3-36 (Method 3114 B).
- [31] Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st ed., 2005. Chapter 3000, p. 3-23 - 3-24 (Method 3112 B).
- [32] 5 Day BOD test, in: STANDARD methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. Washington: APHA; AWWA; WEF, 2005 p.5: 2-7 (Method 5210 B).

- [33] Open reflux method, in: STANDARD methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. Washington: APHA; AWWA; WEF, 2005 p.5: 15-16 (Method 5220 B).
- [34] Anionic surfactants as MBAS, in: STANDARD methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. Washington: APHA; AWWA; WEF, 2005 p.5: 50-53 (Method 5540 C).
- [35] Total suspended solids dried at 103-105°C, in: STANDARD methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. Washington: APHA; AWWA; WEF, 2005 p. 2-58 (Method 2540 D).
- [36] Total solids dried at 103-105°C, in: STANDARD methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. Washington: APHA; AWWA; WEF, 2005 p. 2-56 (Method 2540 B).
- [37] Eletrometric method, in: STANDARD methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. Washington: APHA; AWWA; WEF, 2005 p.4: 90-94 (Method 4500-H⁺ B).
- [38] Soxlet extraction method, in: STANDARD methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. Washington: APHA; AWWA; WEF, 2005 p.4: 90-94 (Method 4500-H⁺ B).
- [39] Titration method, in: STANDARD methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. Washington: APHA; AWWA; WEF, 2005 p.2: 27-29 (Method 2320 B).
- [40] EDTA Titration Method, in: STANDARD methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. Washington: APHA; AWWA; WEF, 2005 p.2: 37-39 (Method 2340 C).
- [41] Introduction and sample preparation, in: STANDARD methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. Washington: APHA; AWWA; WEF, 2005 p.4: 146-151 (Method 4500-P A e B).
- [42] Cadmium reduction method, in: STANDARD methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. Washington: APHA; AWWA; WEF, 2005 p.4: 123-125 (Method 4500-NO₃⁻ E).
- [43] Colorimetric method, in: STANDARD methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. Washington: APHA; AWWA; WEF, 2005 p.4: 118-119 (Method 4500-NO₂⁻ B).
- [44] Introduction and preliminary distillation step, in: STANDARD methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. Washington: APHA; AWWA; WEF, 2005 p.4: 108-110 (Method 4500-NH₃ A e B).
- [45] Azide modification method, in: STANDARD methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. Washington: APHA; AWWA; WEF, 2005 p.4: 138-140 (Method 4500-O C).
- [46] Iodometric method, in: STANDARD methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. Washington: APHA; AWWA; WEF, 2005 p. 4: 183-184 (Method 4500-S² F).
- [47] Iodometric method, in: STANDARD methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. Washington: APHA; AWWA; WEF, 2005 p. 4-176 (Method 4500-S² F).
- [48] Preliminary distillation step, in: STANDARD methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. Washington: APHA; AWWA; WEF, 2005 p.4: 83-84 (Method 4500-F⁻ B).
- [49] J.L.W. Knie, E.W.B. Lopes. Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: FATMA/GTZ, 289 p., 2004.

- [50] Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT. Ecotoxicologia Aquática Toxicidade Aguda, Teste com peixes. NBR 15088 (2004) 1-23.
- [51] Á.M.M.C. Gontijo, R.E. Barreto, G. Speit, V.A.V. Reyes, G.L. Volpato, D.M.F. Salvadori. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. *Mutat. Res.: Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 534 (2003) 165-172.
- [52] G. Speit, A. Hartmann, The comet assay (Single-cell gel test), A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair, in: Henderson, D.S. (Ed.), *Methods in Molecular Biology: DNA Repair Protocols – Eukaryotic Systems*, v. 113, Human Press, Totowa, 1999, pp. 203-211.
- [53] M.V. Ferraro, A.S. Fenocchio, M.S. Mantovani, M.M. Cestari, C.A.O. Ribeiro, Mutagenic effects of tributyltin (TBT) and inorganic lead (PbII) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the Comet Assay, Piscine Micronucleus and Chromosome Aberrations tests, *Genet. Mol. Biol.* 27 (2004) 103-107.
- [54] A.R. Collins, A.G. Ma, S.J. Duthie, The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidine) in human cells, *Mutat. Res.* 336 (1995) 69-77.
- [55] T. Ueda, M. Hayashi, N. Koide, T. Sofuni, J. Kobayashi. A preliminary study of the micronucleus test by acridine orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells. *Water Sci. Technol.* 25 (1992) 235-240.
- [56] K.R. Carrasco; K.L. Tilbury; M.S. Myers, Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47 (1990) 2123-2136.
- [57] T. Çavas; S. Ergene-Gozukara, Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine orange fluorescent staining. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19 (2005) 107-111.
- [58] S. Pacheco; M.A. Santos, Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 53 (2002) 331-347.
- [59] M.A. Hamilton, R.C Russo, R.V. Thurston, Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11 (1977) 714-719.
- [60] Comissão Estadual de Controle Ambiental - CECA- Critérios e padrões para lançamento de efluentes líquidos. Deliberação CECA nº 1007, NT-202.R-10, de 04 de dezembro de 1986.
- [61] National Environment Council (Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA) Statutory Instrument 357/2005.
- [62] Secretaria da Saúde e do Meio Ambiente – SSMA. Critérios e padrões de emissão de efluentes líquidos. PORTARIA N.º 05/89.
- [63] Secretaria Estadual de Meio Ambiente – SEMA. Condições e padrões de lançamento de efluentes líquidos industriais. Resolução SEMA xxxxx/2007, Anexo 4.
- [64] G.R. Scott, K.A. Sloman, The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity: Review, *Aquat. Toxicol.* 68 (2004) 369-392.
- [65] M.B. Masutti, E.L.G. Espíndola, A.M.Nogueira, F.C.F. Simões, Sensibilidade a Cobre e Cromo por *Oreochromis niloticus* e *Pistia stratiotes*. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* 1 (2006) 37-42.
- [66] C.H. Eigenmann, The American Characidae, *Memoirs Museum of Comparative Zoology* 43 (1921) 209-310.

- [67] V. Garutti, H.A. Britski, Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. Comunicações do Museu de Ciência e Tecnologia, PUCRS, Série Zoologia. 13 (2000) 65-88.
- [68] C.B. Schreck, W. Contreras-Sanchez, M.S. Fitzpatrick, Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny, *Aquaculture* 197 (2001) 3-24.
- [69] C.B. Schreck, Accumulation and long-term effects of stress, in: G.P. Moberg, J.A. Mench Eds., *The Biology of Animal Stress: Assessment and Implications for Welfare*. CAB International, Wallingford, 2000.
- [70] K.J. Puckett, L.M. Dill, The energetics of feeding territoriality in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), *Behaviour* 92 (1985) 97-111.
- [71] J.I. Johnsson, J. Parkkonen, L. Förlin, Reduced territorial defence in rainbow trout fry exposed to a paper mill effluent: using the mirror image stimulation test as a behavioural bioassay, *J. Fish. Biol.* 62 (2003) 959-964.
- [72] M.J. Landman, M.R. van den Heuvel, M. Finley, H.J. Bannon, N. Ling, Combined effects of pulp and paper effluent, dehydroabietic acid, and hypoxia on swimming performance, metabolism, and hematology of rainbow trout, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65 (2006) 314-322.
- [73] C.B. Schreck, B.L. Olla, M.W. Davis, Behavioral responses to stress, in: G. W. Iwama, J. Sumpter, J., A. D. Pickering, C. B. Schreck. Eds. *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1997, pp. 745-770.
- [74] M.E. Gourley, C.J. Kennedy, Energy allocations to xenobiotic transport and biotransformation reactions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during energy intake restriction, *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 150 (2009) 270-278.
- [75] R.A. Drummond, C.L. Russom, Behavioral toxicity syndromes, a promising tool for assessing toxicity mechanisms in juvenile fathead minnows, *Environ. Toxicol. Chem.* 9 (1990) 37-46.
- [76] J. Cohn, R.C. MacPhail, Ethological and experimental approaches to behavior analysis: implications for ecotoxicology, *Environ. Health Perspect.* 104 (1996) 299-304.
- [77] P. Kavitha, J. Venkateswara Rao, Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos, *Pesticide Biochemistry and Physiology* 87 (2007) 182-188.
- [78] M.G. Henry, G.J. Atchison, Behavioral Changes in Social Groups of Bluegills Exposed to Copper, *Transactions of the American Fisheries Society*. 115 (1986) 590-595.
- [79] E.E. Little, S.E. Finger, Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 9 (1990) 13-19.
- [80] L.R. Vieira, C. Gravato, A.M.V.M. Soares, F. Morgado, L. Guilhermino, Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behaviour. *Chemosphere* 76 (2009) 1416-1427.
- [81] L. Rixian, H. Huasheng, W. Xinhong, W. Kejian, W. Chunguang, The genotoxic effects of benzo[a]pyrene and methamidophos on black porgy evaluated by comet assay, *Chinese J. Oceanol. Limnol.* 23 (2005) 455-460.
- [82] N.G. Espina, P. Weis, DNA Repair in Fish From Polluted Estuaries, *Mar. Environ. Res.* 39 (1995) 309-312.
- [83] W.M. David, D.L. Mitchell, R.B. Walter, DNA repair in hybrid fish of the genus *Xiphophorus*, *Review. Comp. Biochem. Physiol.* 138 (2004) 301-309.

- [84] G. Frenzilli, M. Nigro, B.P. Lyons, The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutat. Res.: Rev. Mutat. Res.* 681 (2009) 80-92.
- [85] J.S. Barbosa, T.M. Cabral, D.N. Ferreira, L.F. Agnez-Lima, S.R. Batistuzzo de Medeiros, Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73 (2010) 320-325.
- [86] C.L. Mitchelmore, J.K. Chipman, DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring, *Mutat. Res.* 399 (1998) 135-147.
- [87] A. Dhawan, M. Bajpayee, D. Parmar, Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models, *Review.: Cell. Biol. Toxicol.* 25 (2009) 5-32.
- [88] Y. Deguchi, T. Toyoizumi, S. Masuda, A. Yasuhara, S. Mohri, M. Yamada, Y. Inoue, N. Kinae, Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish, *Mutat. Res.* 627 (2007) 178-185.
- [89] P.L. Lima, J.C. Benassi, R.C. Pedrosa, J. Dal Magro, T.B. Oliveira, D. Wilhelm Filho, Time-course variations of DNA damage and biomarkers of oxidative stress in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to effluents from a swine industry, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50 (2006) 23-30.
- [90] C. Sullivan, C.L. Mitchelmore, R.C. Hale, P.A. Van Veld, Induction of CYP1A and DNA damage in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) following exposure to biosolids. *Sci. Total Environ.* 384 (2007) 221-228.
- [91] I. Caliani, S. Porcelloni, G. Mori, G. Frenzilli, M. Ferraro, L. Marsili, S. Casini, M.C. Fossi, Genotoxic effects of produced waters in mosquito fish (*Gambusia affinis*), *Ecotoxicol.* 18 (2009) 75-80.
- [92] C. Russo, L. Rocco, M.A. Morescalchi, V. Stingo, Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57 (2004) 168-174.
- [93] G. Wirzinger, L. Weltje, J. Gercken, H. Sordyl, Genotoxic damage in field-collected three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.): A suitable biomonitoring tool?. *Mutat. Res.* 628 (2007) 19-30.
- [94] R.K. Das; N.K. Nanda, Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of the fish, *Heteropneustes fossilis*, by mitomycin C and paper mill effluent. *Mutat. Res.* 175 (1986) 67-71.
- [95] J.C. Nepomuceno; I. Ferrari; M.A. Spanó; A.J. Centeno, Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* exposed to metallic mercury. *Environ. Mol. Mutagen.* 30 (1997) 293-297.
- [96] R.C. Williams; C.D. Metcalfe, Development of an in vivo hepatic micronucleus assay with rainbow trout, *Aquatic Toxicol.* 23 (1992) 193-202.
- [97] R.D. Dinnen; S.M. Tomlinson; D. Hart, C. Chopra; J.A. Heddle, Application of a micronucleus assay to the peripheral blood cells of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 1607 (1988) 69-78.
- [98] I. Udriou. The micronucleus test in piscine erythrocytes, *Aquatic Toxicol.* 79 (2006) 201-204.
- [99] T. Polard; S. Jean; G. Merlina; C. Laplanche; E. Pinelli; L. Gauthier. Giemsa versus acridine orange staining in the fish micronucleus assay and validation for use in water quality monitoring, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74 (2011) 144-149.

- [100] M. Hayashi; T. Ueda; K. Uyeno; K. Wada; N. Kinae; K. Saotome; N. Tanaka; A. Takai; Y.F. Sasaki; N. Asano; T. Sofuni; Y. Ojima. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms, *Mutat. Res.* 399 (1998) 125-133.
- [101] T. Çavas; N.N. Garanko; V.V. Arkhipchuk. Induction of micronuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate, *Food and Chemical Toxicol.* 43 (2005) 569-574.
- [102] T. Çavas; S. Ergene-Gözükara. Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment, *Environ. Mol. Mutagen.* 46 (2005) 64-70.
- [103] Çavas T, Ergene-Gozukara S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutat. Res.* 538 (2003) 81-91.
- [104] C. Gravato; M.A. Santos, Dicentrarchus labrax biotransformation and genotoxicity responses after exposure to a secondary treated industrial/urban effluent, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55 (2003) 300-306.
- [105] S. Ergene; T. Çavas; A. Çelik; N. Koleli; F. Kaya; A. Karahan, Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotóxico damage in relation to water pollution, *Ecotoxicol.* 16 (2007) 385-391.
- [106] S. Guilherme; M.Válega; M.E. Pereira; M.A. Santos; M. Pacheco, Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (*Liza aurata*) along an environmental mercury contamination gradient, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70 (2008) 411-421.
- [107] S. Summak; N.C. Aydemir; O. Vatan; D. Yilmaz; T. Zorlu; R. Bilaloğlu, Evaluation of genotoxicity from Nilufer stream (Bursa/Turkey) water using Piscine Micronucleus Test, *Food and Chemical Toxicol.* 48 (2010) 2442-2447.
- [108] T. Çavas, In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: Micronucleus test on acridine orange stained fish cells. *Food and Chemical Toxicology* 46 (2008) 352–358.
- [109] A. Murad; A.H. Houston, Maturation of the goldfish (*Carassius aurata*) erythrocyte. *Comp. Biochem. Physiol.* 102A (1992) 107-110. In: M. Tavares-Dias; F. R. de Moraes. *Hematologia de peixes teleósteos*, Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 2004, 144p.
- [110] M. Tavares-Dias; F. R. de Moraes. *Hematologia de peixes teleósteos*, Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 2004, 144p.
- [111] A. Soldatov, Peculiarities of organization and functioning of the fish red blood system. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 41 (1995) 272-281.
- [112] U. Fischer; M. Ototake; T. Nakanishi, Life span of circulating blood cells in ginbuna crucian carp (*Carassius auratus langsdorfii*), *Fish & Shellfish Immunol.* 8 (1998) 589-606. In: M. Tavares-Dias; F. R. de Moraes. *Hematologia de peixes teleósteos*, Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 2004, 144p.
- [113] G. Hevesy; D. Lockner; K. Sletten, Iron metabolism and erythrocyte formation in fish, *Acta Physiol. Scand.* 60 (1964) 256-266. In: M. Tavares-Dias; F. R. de Moraes. *Hematologia de peixes teleósteos*, Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 2004, 144p.
- [114] A. H. Houston; A. Murad, Erythrdynamics in fish – recovery of the goldfish *Carassius auratus* from acute anemia, *Can. J. Zool.* 73 (1995) 411-418. In: M. Tavares-Dias; F. R. de Moraes. *Hematologia de peixes teleósteos*, Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 2004, 144p.

APÊNDICES

Metodologia

1 Teste de toxicidade aguda

O teste foi realizado de acordo com a metodologia descrita pela ABNT (2004), com modificações segundo KNIE e LOPES (2004), sendo utilizado para a obtenção da concentração letal mediana (CL_{50}), que corresponde a concentração real da amostra que causa efeito agudo (letalidade) a 50% dos organismos no tempo de exposição de 96 horas, nas condições de ensaio.

O teste baseia-se na exposição de peixes às amostras de contaminantes em diferentes diluições pelo período de 96 horas, em sistema de fluxo estático. Após o tempo de exposição, é determinado como critério-teste, o número de organismos mortos. Finalizado o experimento, realiza-se o teste de sensibilidade do lote de peixes.

Água de Diluição

A água de diluição é uma água sintética padronizada pelas normas dos testes de toxicidade, é uma solução de qualidade conhecida e altamente segura para o cultivo de organismos e para a execução dos testes.

O procedimento e os reagentes necessários para o preparo da água de diluição estão descritos a seguir:

- a) Preparar à base de água deionizada ou destilada;
- b) No preparo de 100 litros, colocar aproximadamente 20 litros de água no recipiente e adicionar os sais, misturando bem, e completando até o volume final de 100 litros;
- c) Adicionar:
 - 294,0 mg. L^{-1} de cloreto de cálcio di-hidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$);

- 123,3 mg. L⁻¹ de sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO₄. 7 H₂O);
 - 63,0 mg. L⁻¹ de bicarbonato de sódio (NaHCO₃);
 - 5,5 mg. L⁻¹ de cloreto de potássio (KCl);
- d) Aerar a solução por 12 a 24 horas para que o pH se estabilize e a concentração de oxigênio atinja a saturação;
- e) Manter o pH na faixa entre 7,0 e 8,0. Se necessário, ajustar com ácido clorídrico (HCl) 1N ou hidróxido de sódio (NaOH) 1N.

Soluções-Teste

Preparar as soluções-teste em proveta, colocando o volume indicado da amostra para cada concentração e completando para o volume desejado com água de diluição (Tab.1).

Manter o pH na faixa entre 5,0 a 9,0. Se necessário, ajustar para que não cause diretamente a letalidade nos animais de forma que obscureça o efeito de toxicidade dos compostos da solução-teste.

Tabela 1. Exemplo de preparo de soluções-teste.

| Diluição | Fator de Diluição (FD) | Amostra (mL) | Água de diluição (mL) | Volume final (mL) | Concentração da solução-teste (%) |
|----------|------------------------|--------------|-----------------------|-------------------|-----------------------------------|
| Controle | - | - | 3000 | 3000 | - |
| 1 : 1 | 1 | 3000 | - | 3000 | 100 |
| 1 : 2 | 2 | 1500 | 1500 | 3000 | 50 |
| 1 : 3 | 3 | 1000 | 2000 | 3000 | 33,33 |
| 1 : 4 | 4 | 750 | 2250 | 3000 | 25 |
| 1 : 5 | 5 | 600 | 2400 | 3000 | 20 |
| 1 : 6 | 6 | 500 | 2500 | 3000 | 16,67 |
| 1 : n | n | 3000/n | 3000-(3000/n) | 3000 | 100/n |

Teste preliminar

Para amostras de potencial tóxico desconhecido, sejam ambientais ou compostos químicos, é recomendável, antes do teste definitivo, a execução de um teste preliminar para conhecer o intervalo aproximado da sua ação nociva, ou seja, a maior diluição que causa morte a 100 % dos peixes, e a menor diluição na qual não

se observa o efeito. Esses valores-limite definem a diluição inicial, o intervalo entre as diluições e a diluição final da série de diluições do teste definitivo.

O teste preliminar é executado do mesmo modo que o teste definitivo, porém é suficiente apenas um recipiente de teste com 3 litros de solução, 3 peixes por diluição (densidade de estocagem de 1 g. L^{-1}) e um tempo de exposição de até 24 horas. O objetivo desse procedimento é aumentar a eficiência do ensaio, racionalizando o gasto de tempo e material.

Teste definitivo

Realizar o teste em replicata, utilizar no mínimo 10 peixes por solução-teste e manter os indivíduos na densidade de 1 g. L^{-1} .

Iniciar com a distribuição dos peixes do grupo controle (água de diluição) e depois em ordem crescente de concentração, nas soluções-teste, colocando-os rápida e cuidadosamente nos aquários, com o auxílio de um puçá de náilon.

Monitorar diariamente a temperatura e o pH das amostras, pelo menos nas concentrações mais baixa, intermediária e mais alta. Os peixes mortos devem ser retirados imediatamente à observação.

Resultados

Ao final do ensaio, registrar o número total de indivíduos mortos em cada solução-teste. São considerados válidos os resultados que, no término do período de ensaio, atendam aos seguintes requisitos:

- a) a porcentagem dos organismos mortos no controle for inferior ou igual a 10%;
- b) o teor de oxigênio dissolvido final deve ser maior ou igual a 4 mg. L^{-1} ;
- c) a sensibilidade à substância de referência deve estar dentro de uma faixa estabelecida.

Teste de sensibilidade

Para verificar a sensibilidade do organismo-teste ou alterações no ambiente do sistema-teste, determinar a (CL_{50}) para a substância de referência dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$).

A (CL_{50}) obtida deve estar compreendida num intervalo de ± 2 desvios-padrão em relação aos valores médios obtidos para a mesma espécie.

Análise estatística

O cálculo da concentração letal mediana (CL_{50}) foi realizado através do método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al., 1976). Para comparação do efeito letal entre os diferentes tratamentos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

Relatório de ensaio

O relatório de ensaio deve possuir as seguintes informações:

- a) organismo-teste;
- b) todos os dados necessários para identificar a amostra;
- c) data da realização do ensaio;
- d) dados biológicos (porcentagem de efeito nas soluções-teste), físicos e químicos referentes ao ensaio;
- e) resultado do ensaio (CL_{50});
- f) qualquer comportamento anormal dos organismos nas condições de ensaio;
- g) as modificações introduzidas e eventuais ocorrências durante a realização do ensaio;
- g) sensibilidade do organismo-teste a substância de referência;
- h) técnico responsável.

2 Ensaio cometa

A técnica foi descrita por Speit e Hartmann (1999), com alterações segundo Ferraro (2003).

Ensaio cometa com células do sangue

Procedimento para montagem e análise das lâminas:

- a) Coletar 10 µl de sangue de cada animal e misturar com 1 ml de soro bovino fetal; Desta solução, coletar 10 µl de suspensão celular e misturar com 120 µl de agarose LMP, previamente preparada e levemente aquecida (37°C);
- b) Colocar sobre uma lâmina com a cobertura de agarose normal;
- c) Cobrir a lâmina com uma lamínula e levar a geladeira por 15 minutos;
- d) Depois de decorrido o tempo de refrigeração, retirar as lamínulas com cuidado;
- e) Colocar as lâminas em solução de lise dentro de cubetas e manter em refrigerador por 24 horas;
- f) Preparar a cuba de eletroforese mergulhando-a em gelo (4°C) e no escuro;
- g) Colocar as lâminas na cuba horizontal de eletroforese, quando necessário, preencher os espaços vazios com lâminas limpas;
- h) Na cuba de eletroforese, adicionar suavemente o tampão de eletroforese com pH maior que 13, de maneira a cobrir as lâminas;
- i) Manter as lâminas na solução de eletroforese por 30 minutos para a desespiralização do DNA;
- j) Iniciar a corrida de eletroforese a 25V e 300 mA por 25 minutos;
- k) Terminada a eletroforese, retirar as lâminas cuidadosamente e neutralizar com 5 mL de tampão de neutralização (pH 7,5) por 5 minutos;
- l) Repetir a neutralização por mais duas vezes;
- m) Secar as lâminas na posição inclinada e fixar com etanol por 5 minutos;
- n) Para a coloração, adicionar 20 µL de brometo de etídeo (20 mg. L⁻¹) em cada lâmina, cobrir com lamínula e analisar imediatamente.

Ensaio cometa com células das brânquias

O procedimento para montagem das lâminas com o tecido das brânquias consiste das seguintes etapas:

- a) Retirar as brânquias de cada animal;
- b) Acondicionar o tecido em frasco de microcentrífuga do tipo ependorf contendo 1mL de soro bovino fetal. Armazenar estes frascos sob refrigeração e na ausência de luz;
- c) Desagregar o tecido em micro homogeneizador a 1500 rpm por cerca de 30 segundos;
- d) Coletar 50 µL do homogeneizado obtido e misturar com 120 µL de agarose LMP, previamente preparada e levemente aquecida (37°C);
- e) Montar as lâminas com a suspensão celular.

Escores

Analisar sob microscópio de epifluorescência com aumento de 400x em teste cego, 100 cometas em cada lâmina.

Classificar os cometas de acordo com o dano, conforme o comprimento da cauda formada após a corrida de eletroforese, sendo: 0 (sem dano aparente), 1 (pouco dano), 2 (dano moderado), 3 (dano elevado) e 4 (dano máximo). Os cometas em que não é possível visualizar a região da cabeça devem ser desconsiderados da contagem por representarem DNAs totalmente fragmentados, característicos de células inviáveis.

Atribuir escores de danos através da multiplicação do número de cometas encontrados em cada classe pelo valor da classe.

$$\text{Escores} = \{(0 \times n^{\circ} \text{ dano } 0) + (1 \times n^{\circ} \text{ dano } 1) + (2 \times n^{\circ} \text{ dano } 2) + (3 \times n^{\circ} \text{ dano } 3) + (4 \times n^{\circ} \text{ dano } 4)\}$$

Análise estatística

A análise estatística é realizada através de testes não-paramétricos, para a comparação dos escores entre dois grupos utiliza-se o teste de Mann-Whitney e para comparações múltiplas o teste de Kruskal-Wallis.

Preparação das lâminas com cobertura de agarose

- a) Dissolver 1,5 g de agarose normal em 100 mL de PBS em Erlenmeyer, com agitação por duas horas;
- b) Colocar para aquecer;
- c) Após fervura, deixar solidificar a temperatura ambiente;
- d) Picar a agarose em e ferver;
- e) Repetir as etapas “c” e “d”;
- f) Levar para banho-maria a 70°C, o banho deve ficar no nível da agarose;
- g) Mergulhar as lâminas, previamente limpas com etanol, na agarose até alcançar a parte esmerilhada. Procurar fazer uma camada fina de agarose;
- h) Retirar a lâmina e limpar com papel o lado oposto da parte esmerilhada;
- i) Secar “overnight” em temperatura ambiente. Estas lâminas podem ser estocadas por várias semanas.

Preparação da agarose de baixo ponto de fusão (LMP)

- a) Dissolver 0,1 g de agarose de baixo ponto de fusão em 20 mL de PBS;
- b) Colocar para aquecer com agitação constante;
- c) Desligar o aquecedor quando levantar fervura e manter a agitação até diminuir a temperatura da agarose;
- d) Desligar o agitador e deixar solidificar a temperatura ambiente;
- e) Manter na geladeira até o momento do uso.

PBS

- 0,2 g de cloreto de potássio – KCl (PM 74,55).
- 0,2 g de fosfato de potássio monobásico – KH_2HPO_4 (PM 136,09).

- 8 g de cloreto de sódio - NaCl (PM 58,44).
- 1,15 g de hidrogênio fosfato disódico anidro - NaHPO₄ (PM 141,96).
- 1000 mL de água deionizada.

- a) Fazer em balão volumétrico de 1000 mL;
- b) Acrescentar a água até alcançar a marca do balão volumétrico;
- c) Acertar o pH para 7,4;
- d) Estocar em refrigerador;

Solução de Lise – Estoque

Para 1000 mL:

- 890 mL de água destilada.
- 146,1 g de Cloreto de Sódio - NaCl (2,5 M).
- 37,2 g de Ácido Etilenodiaminotetracético - EDTA (100 mM; PM 372,24).
- 1,2 g TRIS 10 mM (PM 121,14).
- 8 g de Hidróxido de Sódio sólido (NaOH PM 40,0).

- a) Dissolver os reagentes em 890 mL de água;
- b) Acertar o pH com NaOH até atingir pH 10,
- c) Adicionar 10 g de lauril sarcosinato de sódio e misturar bem lentamente para evitar a formação de grumos.

Solução de Lise – Uso

Para 100 mL:

- 1 mL de Triton X – 100.
- 10 mL DMSO.
- 89 mL solução estoque.

- a) Adicionar todos os reagentes em uma proveta de 100 mL;
- b) Fazer e manter sempre no escuro.

Solução de Hidróxido de Sódio (NaOH) (300 mM):

- 19,2 g de NaOH.
- 48 mL de água deionizada.

a) Agitar.

Ácido Etilenodiaminotetracético - EDTA (200 Mm) – Estoque

- 14,89 mL de EDTA.
- 200 mL de água deionizada.

a) Acertar o pH para 10 com pastilhas de NaOH;

b) A solução pode ser estocada.

Tampão de Eletroforese

- 1600 mL de água destilada gelada (4°C).
- 8 mL de EDTA (200 Mm).
- 48 mL da solução de NaOH.

a) Agitar;

b) Acertar o pH para maior 13 com pastilhas de NaOH.

Tampão de Neutralização

- 51,04 g de TRIS.
- 1000 mL de água deionizada.

a) Agitar;

b) Acertar o pH para 7,5 com Ácido clorídrico (HCL).

Solução de Coloração – Estoque

- 10 mg de Brometo de Etídio.
- 50 mL de água deionizada.

Solução de Coloração – Uso

- 1 mL de solução estoque.
- 9 mL de água deionizada.

Descontaminação das lâminas

- Deixar as lâminas expostas à luz por uma semana;
 - Após este período colocar de molho na solução de descontaminação por 24 horas;
 - Neutralizar a solução com bicarbonato de sódio (NaHCO_3);
 - Lavar as lâminas utilizando luvas.
-
- a) 1L de água;
 - b) 13,6 g de nitrito de sódio (NaNO_2);
 - c) 67 mL de ácido hipofosforoso (H_3PO_2).

3 Teste do micronúcleo com coloração fluorescente de laranja de acridina

O teste do micronúcleo (MN) com coloração fluorescente de laranja de acridina em eritrócitos foi realizado de acordo Ueada *et al* (1992) e utilizada para a determinação da frequência de micronúcleos, de alterações morfológicas nucleares (AMN) e verificação do efeito do contaminante no processo de eritropoiese através da análise da frequência de eritrócitos policromáticos ou imaturos.

- a) Coletar o sangue periférico;
- b) Diluir o sangue com a mesma quantidade de soro bovino fetal;
- c) Fazer esfregaço com a suspensão celular obtida;
- d) Secar as lâminas “overnight”;
- e) Fixar com metanol por 10 minutos;
- f) Corar as lâminas com 20 µL de laranja de acridina a 0,003% em tampão Sorenson's com pH 6,8 por 2–3 minutos;
- g) Enxaguar brevemente as lâminas com o tampão ou com água destilada;
- h) Analisar imediatamente em microscópio de epifluorescência, em aumento de 1000x;
- i) Analisar em teste cego 1000 células/peixe.

Identificação de eritrócitos imaturos

A identificação de eritrócitos imaturos e de MN foi realizada segundo Çavas e Ergene-Gözükara (2005). A laranja de acridina cora seletivamente eritrócitos imaturos ou policromáticos. Sob microscópio fluorescente, micronúcleos e os principais núcleos apresentam forte fluorescência verde-amarelo e entre todas as células os eritrócitos imaturos podem ser facilmente identificados pelo seu conteúdo de RNA citoplasmático, apresentando fluorescência vermelha no citoplasma.

O critério para a identificação de eritrócitos jovens micronucleados será o seguinte:

- a) O micronúcleo não pode ultrapassar um terço do tamanho do núcleo principal.
- b) O micronúcleo deve estar claramente separado do núcleo principal.

c) O micronúcleo deve estar no mesmo plano de foco e ter a mesma cor e refringência do núcleo principal.

As alterações na forma elíptica normal dos núcleos das hemácias que não se enquadraram no conceito de micronúcleo, também são analisadas, sendo descritas como alterações morfológicas nucleares (CARRASCO; TILBURY; MYERS, 1990).

Classificação das alterações morfológicas nucleares (AMN)

Em peixes, diversos tipos de anomalias nucleares ainda não apresentam sua origem completamente compreendida. Carrasco, Tylbury e Myers (1990), descreveram e fotografaram as alterações morfológicas encontradas em núcleos de eritrócitos de peixes. Essas lesões foram basicamente classificadas em:

- a) *Blebbbed*: núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina (mais escuro). O tamanho destas evaginações varia desde pequenas protuberâncias a estruturas completamente circunscritas, semelhantes aos micronúcleos, mas ainda ligadas ao núcleo principal;
- b) *Lobed*: núcleos com evaginações mais largas do que as descritas para os blebbed. Sua estrutura não é tão definida como a anterior. Alguns núcleos apresentam várias destas estruturas;
- c) *Vacuolated*: núcleos que apresentam uma região que lembra os vacúolos no seu interior. Estes “vacúolos” apresentam-se destituídos de qualquer material visível no seu interior;
- d) *Notched*: núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma. Geralmente com uma profundidade apreciável no núcleo. Esses cortes parecem não possuir nenhum material nuclear e parecem ser delimitados pela membrana nuclear.

Cálculo da frequência de eritrócitos imaturos (%EI)

Calcula-se o escore de eritrócitos imaturos para cada 1000 eritrócitos amostrados por peixe. Os resultados são apresentados como uma frequência (%_o), conforme descrito por Pacheco e Santos (2002), utilizando-se a seguinte expressão:

$$\text{Frequência de eritrócitos imaturos (\%EI)} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{EIs}}{\text{N}^{\circ} \text{EIs} + \text{N}^{\circ} \text{EMs}} \times 1000$$

Onde:

N^o EIs = N^o eritrócitos imaturos;

N^o EMs = N^o eritrócitos maturos;

Análise estatística

Após a obtenção das frequências, compara-se os grupos através do teste de Mann-Whitney para duas amostras e Kruskal Wallis para comparações entre mais amostras.

ANEXOS

1 Certificação do comitê de ética em experimentação animal



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEa)



Nº 457

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEa) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEa, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEa, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEa internal regiment, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075.023545/2010-04

APROVADO: 06/07/2010 – R.O. 06/2010



TÍTULO: Avaliação da genotoxicidade em *Astyanax altiparanae* (Characidae) expostos a efluentes químicos pré e pós-tratamento



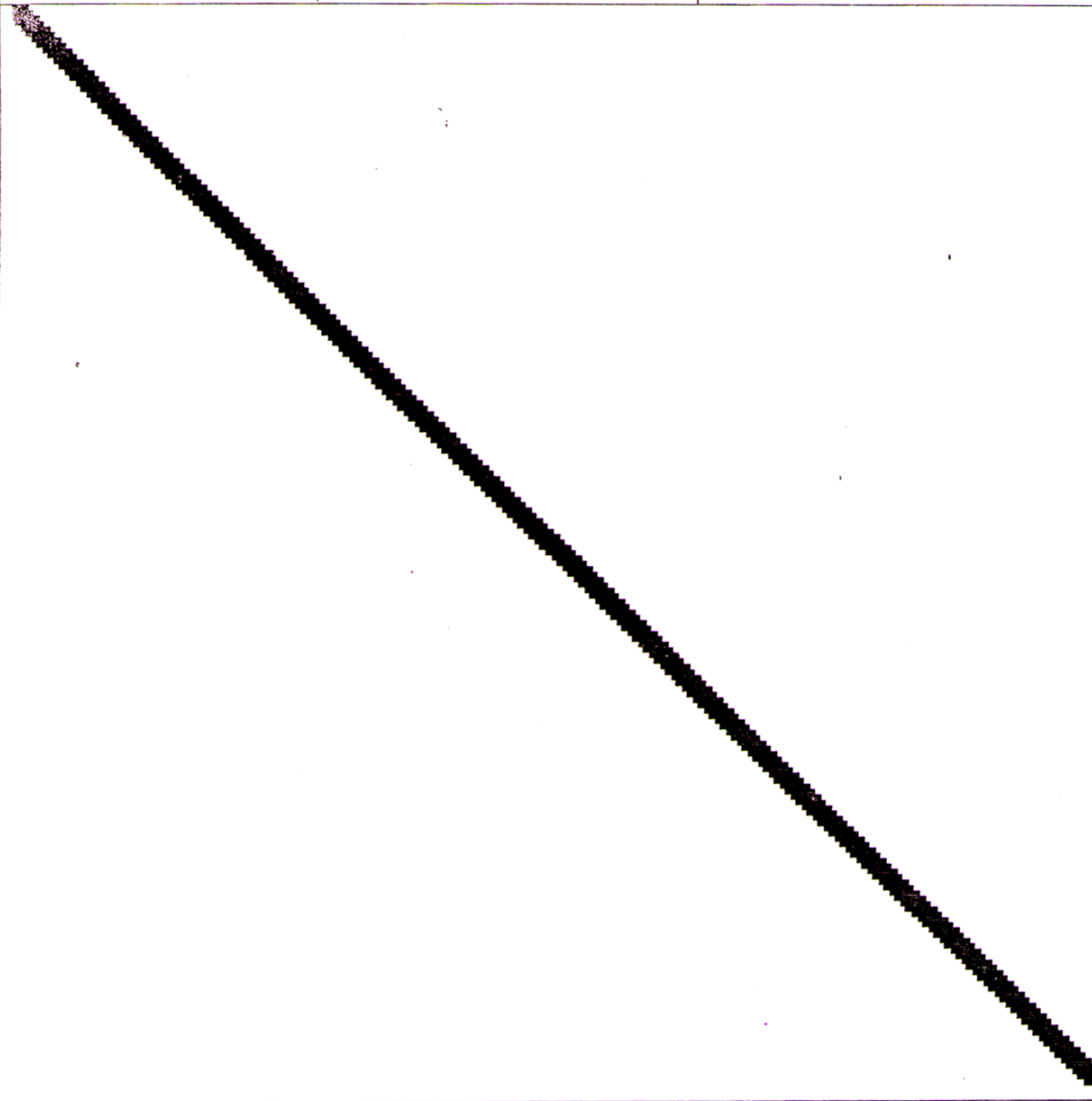
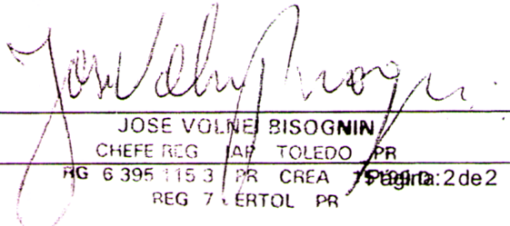
AUTORES: Marta Margareth Cestari, Carlos Itsuo Yamamoto, Gabriele Limberger Galvan

DEPARTAMENTO: Genética

Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio
Coordenador do CEEa

2 Licença ambiental da piscicultura fornecedora dos peixes

| | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|  Secretaria do Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos |  IAP INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ Instituto Ambiental do Paraná Diretoria de Controle de Recursos Ambientais | Licença de Operação Nº 16624 Validade 18/08/2013 Protocolo 70844974 |
| O Instituto Ambiental do Paraná - IAP, com base na legislação ambiental e demais normas pertinentes, e tendo em vista o contido no expediente protocolado sob o nº 70844974, expede a presente Licença de Operação à: | | |
| 01 IDENTIFICAÇÃO DO AUTORIZADO | | |
| Razão Social - Pessoa Jurídica / Nome - Pessoa Física | | |
| SERGIO KASUO AKIYOSHI | | |
| C.G.C. - Pessoa Jurídica / C.P.F. - Pessoa Física 31768210934 | Inscrição Estadual - Pessoa Jurídica / R.G. - Pessoa Física 892611 | |
| Endereço RUA BONFIM, Nº 1895 | | |
| Bairro CENTRO | Município Toledo | UF PR Cep 85900000 |
| 02 IDENTIFICAÇÃO DO EMPREENDIMENTO | | |
| Empreendimento | | |
| SERGIO KASUO AKIYOSHI | | |
| Tipo de empreendimento/atividade | | |
| Piscicultura | | |
| Endereço Linha Mandariná | | Bairro ***** |
| Município Toledo | | Cep 85900000 |
| Corpo Hídrico do Entorno Rio Toledo | | Bacia Hidrográfica Paraná III |
| Destino do Esgoto Sanitário Infiltração no Solo | | Destino do Efluente Final Corpo Hídrico |
| 03 REQUISITOS DO LICENCIAMENTO DE OPERAÇÃO | | |
| <ul style="list-style-type: none"> Súmula desta licença deverá ser publicada no Diário Oficial do Estado e em jornal de grande circulação local ou regional, no prazo máximo de 30 (trinta) dias, nos termos da Resolução CONAMA nº 006/86. Esta LICENÇA DE OPERAÇÃO tem a validade acima mencionada, devendo a sua renovação ser solicitada ao IAP com antecedência mínima de 120 (cento e vinte) dias. Quaisquer alterações ou expansões nos processos de produção ou volumes produzidos pela indústria e alterações ou expansões no empreendimento, deverão ser licenciados pelo IAP. Esta LICENÇA DE OPERAÇÃO deverá ser afixada em local visível | | |
| Detalhamento dos Requisitos de Licenciamento | | |
| <p>Esta Licença de Operação, trata-se de solicitação, conforme protocolo nº 7.084.497-4. A presente Autorização, foi emitida de acordo com o que estabelecem os Art 8º, inciso II da Resolução Nº 237/97 - CONAMA, de 19 de dezembro de 1997 e 2º, inciso II as resoluções SEMA/IAP, de 24 de agosto de 1998 e conforme o artigo 3º, inciso I, letras a e b, DA RESOLUÇÃO Conjunta nº 002/08 - IBAMA/SEMA/IAP, de 16 de janeiro de 2008, que autoriza a instalação propriamente dita do empreendimento e atividade, devendo ser observado, rigorosamente, e (os) respectivos projetos de engenharia apresentados pelo requerente e aprovado por este IAP, componente do processo administrativo objeto da presente Licença de Operação:</p> <ul style="list-style-type: none"> - A qualidade da água da sanga a jusante, deverá no trecho de influencia da piscicultura atender os parâmetros físicos químico, determinados pelo art. 14º da resolução nº 357/2005, CONAMA. Ainda, devendo ser observado a normativa quanto aos aspectos locacional do empreendimento em concordância com as diretrizes de Licenciamento deste órgão Ambiental. - São de inteira responsabilidade do engenheiro projetista e do contratante a perfeita operacionalização e manutenção do projeto apresentado; - A tender as normas estabelecidas pela SEAB, quanto à sanidade dos peixes; - Fica terminantemente proibida a soltura de peixes exóticos diretamente na sanga a jusante; - Os viveiros deverão ter telas, no intuito de evitar a fuga indesejada de peixes; - A concessão desta autorização não impedirá exigências futuras, decorrentes do avanço tecnológico ou da modificação das condições ambientais, conforme Decreto Estadual Nº857/79 - Art 7º, Parágrafo II. <p>O não cumprimento á legislação ambiental sujeitara a empresa, as sanções, previstas na Lei Federal Nº9.605/98 e no Decreto Nº6514/2008</p> | | |

| | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|  Secretaria do Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos |  IAP INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ Instituto Ambiental do Paraná Diretoria de Controle de Recursos Ambientais | Licença de Operação Nº 16624 Validade 18/08/2013 Protocolo 70844974 |
|  | | |
| Local e data Toledo, 18 de agosto de 2008 | | |
| O proprietário requerente acima qualificado não consta nesta data, como devedor no cadastro de autuações ambientais do Instituto Ambiental do Paraná. | Carimbo e assinatura do representante do IAP  | |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> Impressa: 19/08/2008 08:02:45 </div> <div> JOSE VOLNEI BISOGNIN CHEFE REG IAP TOLEDO PR RG 63951153 PR CREA 70844974 REG 7 TOLEDO PR </div> <div> Página: 2 de 2 </div> </div> | | |